

**Université de Sherbrooke**

**Rôles des protéines virales VP2 et VP3 dans la  
recombinaison de l'ADN du virus du polyome**

**Par**

**Sylvain Charbonneau**

**Département de microbiologie et infectiologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M. sc.)**

**Mai 2000**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56879-2

# TABLE DES MATIÈRES

Table des matières .....	I
Liste des illustrations .....	III
Liste des abréviations.....	IV
Résumé.....	VI
 <b>Introduction</b> .....	 1
A. Préambule.....	1
B. Le virus de polyome.....	4
C. Modèle RmI.....	9
D. La recombinaison chez RmI.....	14
E. Recombinaison et transcription.....	16
F. Recombinaison et protéines tardives (VP1, VP2 et VP3).....	18
 <b>Matériel et méthodes</b> .....	 21
A. Clonage moléculaire.....	21
1. Traitement enzymatique des molécules d'ADN.....	21
2. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	21
3. Isolement de fragment sur gel préparatif.....	22
4. Transformation bactérienne et sélection des recombinants.....	22
5. Amplification et purification des plasmides.....	23
6. Amplification de l'ADN par PCR.....	23
7. Technique de séquençage.....	24
B. Essais de recombinaison.....	24
1. Cellules.....	24
2. Préparation de l'ADN avant la transfection.....	25
3. Transfection.....	25
4. Extraction de l'ADN de faible poids moléculaire.....	26
5. Buvarage de type Southern.....	27
6. Préhybridation, hybridation.....	27
7. Mesure densitométrique.....	28
8. Marquage de l'ADN <i>in vitro</i> .....	28
9. Essais de complémentation.....	29

C. Analyses protéiques.....	30
1. Extraction des protéines. ....	30
2. Immunobuvardage. ....	30
D. Essais d'infection.....	31
1. Extraction du virus et titrage. ....	31
2. Passage à l'aveugle. ....	32
E. Construction des ADN plasmidiques .....	32
1. Vecteur plasmidique pNN.....	32
2. Plasmides recombinants. ....	35
3. Mutants RmI des protéines tardives mineures.....	38
4. Mutants P155 des protéines tardives mineures. ....	43
5. Élaboration des vecteurs d'expression. ....	46
F. Synthèse des fragments PCR.....	54
Liste des amorces utilisées pour cette étude. ....	54
<b>Résultats</b> .....	57
A. Mutations des protéines tardives mineures chez RmI.....	58
B. Effets des mutations chez la molécule P155.....	65
C. Production d'hémagglutinines. ....	69
D. Analyse des protéines tardives par immunobuvardage.....	74
E. Essais de complémentation des mutants RmI S, S1 et S2.....	83
<b>Discussion</b> .....	91
A. Phénotype des mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2.....	91
B. Effet des mutations sur la conversion de RmI en P155.....	95
C. Modèle de l'implication des protéines mineures dans la recombinaison.....	98
D. Conclusion.....	101
<b>Remerciements</b> .....	102
<b>Bibliographie</b> .....	103

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	Organisation fonctionnelle du génome de Py. ....	5
Figure 2.	Carte physique de RmI et du produit de recombinaison P155.....	11
Figure 3.	Carte physique des vecteurs plasmidiques.....	33
Figure 4.	Carte physique des plasmides recombinants.....	36
Figure 5.	Génération par PCR des mutations de la région tardive.....	39
Figure 6.	Introduction des mutations de la région tardive dans la molécule RtsP155. ....	44
Figure 7.	Carte physique des vecteurs d'expression de type pCMV OriPy. ....	48
Figure 8.	Cartes physiques des vecteurs d'expression de type pLRP. ....	51
Figure 9.	Effets des mutations des protéines mineures sur la recombinaison de RmI.....	61
Figure 10.	Évaluations densitométriques du taux de recombinaison des molécules RmI.....	63
Figure 11.	Effets des mutations non-sens sur l'accumulation des molécules P155. ....	67
Figure 12.	Analyse de la capacité des molécules P155 mutantes à hémagglutiner. ....	71
Figure 13.	Effets des mutations non-sens chez P155 sur la propagation virale.....	75
Figure 14.	Analyses protéiques des molécules P155 mutées par immunobuvardage. ....	79
Figure 15.	Effets des mutations sur les protéines tardives.....	81
Figure 16.	Vecteurs d'expression protéique de type pCMV. ....	84
Figure 17.	Vecteurs d'expression de type pLRP.....	88

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

a.a :	Acide aminé
ADN :	acide déoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
CMV :	“cytomegalovirus”
d.b. :	double brin
DMEM :	Dulbecco’s modified Eagle medium
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DOC Na :	Déoxycolate de sodium
ECL :	“enhanced chemi-luminescence”
EDTA :	éthylènediamine tétraacétate
EGFP :	“enhanced green fluorescent protein”
HAU :	unité d’hémagglutination
HRP :	“horseradish peroxydase”
Ins :	Insertion
Kda :	Kilodalton
Kpb :	kilo paires de bases
LT	antigène grand T
MMTV	virus de tumeur mammaires de la souris
MT :	antigène moyen T
NLS :	signal de localisation nucléaire

nt :	nucléotide
Ori :	origine de réplication
p.m.	poids moléculaire
pb :	paire de bases
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PFU :	unité de formation de plaque
PVDF :	Difluorure de polyvinylidène
Py :	polyome
RDE :	enzyme de destruction des récepteurs
RS :	recombinaison entre les répétitions S
s.b. :	simple brin
SDS :	sodium dodécyl sulfate
ST :	antigène petit T
SV40 :	virus simien 40
SVF :	sérum de veau fœtal
TE :	Tris-EDTA
ts :	thermosensible

## RÉSUMÉ

Nous étudions la recombinaison homologue dans les cellules de souris à l'aide du modèle RmI. Découlant de l'excision de l'ADN viral du génome de souris, RmI est constitué de 1.03 copie du génome Py et d'une insertion (Ins) de 1628 pb d'ADN de souris. De part et d'autre de l'Ins, se retrouve une répétition virale directe de 182 pb (répétitions S). Lorsque RmI est transfectée dans des cellules de souris, elle se convertit très efficacement en ADN Py de longueur unitaire (P155) par recombinaison entre les répétitions S (recombinaison S ou SR). Incapable de s'encapsider en raison de sa taille, RmI doit subir une recombinaison SR pour permettre au produit P155 de poursuivre le cycle viral. Mentionnons également que l'insertion d'ADN génomique de souris entrecoupe le gène de la protéine de structure majeure VP1 sans toutefois affecter la structure des gènes codant pour les protéines mineures VP2 et VP3. La recombinaison SR permet cependant la synthèse de la protéine VP1 complète.

Le projet visant à déterminer si les protéines tardives ont un rôle à jouer au niveau de la recombinaison découle de certaines observations axées sur l'implication de l'activité transcriptionnelle au niveau de la recombinaison SR. Effectivement, des modifications introduites au niveau de certaines régions reconnues pour réguler la transcription, réduisent fortement la recombinaison chez RmI. De plus, la découverte de l'implication au niveau de la recombinaison d'un troisième site de liaison au facteur de transcription YY1 s'ajoute à nos observations. Capable d'agir en cis, le site Y3 venait confirmer l'importance de la transcription de la région tardive pour la conversion de RmI en P155. L'analyse de l'implication des protéines de la région tardive au niveau de la recombinaison devenait alors pertinente.



L'analyse de l'implication des protéines tardives au niveau de la recombinaison, s'effectua essentiellement par l'introduction de mutations ponctuelles au niveau des gènes tardifs. L'introduction de modifications au niveau du gène encodant la protéine majeure VP1 a permis de constater et d'étudier le rôle de sa forme tronquée, soit VPX, au niveau de la recombinaison chez RmI. Mais, étant responsable du transport au noyau des protéines mineures, les modifications affectant l'intégrité de VP1 nuisaient également au transport au noyau des protéines VP2 et VP3. Une analyse visant essentiellement les protéines VP2 et VP3 s'avérait donc nécessaire pour déterminer leur rôle et de bien discerner leur implication au niveau de la recombinaison de RmI. Trois mutations ponctuelles créant des codons non-sens au niveau de la région codante des protéines mineures ont alors été introduites aux positions 4684, 4613 et 4078. Ces modifications provoquent la terminaison précoce de la traduction créant ainsi des protéines mineures tronquées. Bien que ces mutants présentent un profil différent quant à leur production de protéines tardives, leur comportement au niveau de la recombinaison s'avère être sensiblement le même. Les mutations au niveau des protéines mineures semblent inhiber la recombinaison intramoléculaire de RmI.

L'étude réalisée sur l'implication de la protéine VP1 ainsi que les résultats obtenus sur l'implication des protéines VP2 et VP3 nous ont permis d'émettre certaines hypothèses quant à leur rôle dans la recombinaison. C'est alors qu'à la lumière de ces derniers résultats et en relation avec les études antérieures, un nouveau modèle de recombinaison chez RmI a pu être élaboré. Nous proposons donc, que les protéines mineures sont importantes pour la recombinaison et ce, en collaboration avec la protéine VPX ou VP1. Leur présence au noyau sous forme de complexe serait responsable de la mise en place d'un environnement propice à la conversion de RmI en P155. Leur

capacité à lier la matrice nucléaire ainsi qu'à relocaliser les nucléosomes de la chromatine virale, pourraient contribuer à favoriser l'événement de recombinaison probablement promu par la machinerie transcriptionnelle.

# **INTRODUCTION**

## **A) Préambule.**

Pour qu'une cellule puisse se développer, se maintenir et se multiplier, il doit avoir une coordination dans l'espace et dans le temps d'une gamme précise d'activités enzymatiques. Parmi le nombre impressionnant de fonctions biochimiques présentes dans les cellules, existe la recombinaison génétique. Ce processus moléculaire, observé chez tout type cellulaire, est probablement une des principales causes de la diversité évolutive. Au cours des dernières décennies plusieurs phénomènes de recombinaison ont été observés et étudiés. Et selon ces observations, la recombinaison génétique a été divisée en quatre types de réarrangements majeurs : la recombinaison site-spécifique, la recombinaison homologue, la recombinaison illégitime et la transposition. Dans le premier cas, soit la recombinaison site-spécifique, la réaction biochimique est régulée de façon très précise. Effectivement, ce type de modification fait intervenir une machinerie enzymatique spécialisée qui agit sur des sites bien déterminés et dont l'homologie peut se réduire à moins de 10 paires de bases. Les enzymes impliquées, regroupées sous l'appellation de recombinases, catalysent les cassures et les réunions de l'ADN en des sites bien précis. Contrairement à la recombinaison site-spécifique, les autres réarrangements ne se déroulent pas sous un niveau de régulation aussi serré. Étant difficile à cerner, ces processus de recombinaison sont de loin moins bien connus (principalement chez les eucaryotes). La recombinaison homologue, comme son nom l'indique, désigne un réarrangement de l'ADN impliquant deux séquences identiques, ou différant seulement par quelques nucléotides. La fréquence de recombinaison observée est généralement proportionnelle à l'importance de l'homologie. Quant à la

recombinaison illégitime, elle fait référence à tous les événements n'appartenant ni à la recombinaison homologue, ni à la recombinaison site-spécifique. Ce type de recombinaison représente sans doute la majorité des événements de recombinaison ayant lieu chez les cellules de mammifères. La recombinaison illégitime est moins fréquente dans la cellule procaryote ou de levure que dans la cellule de mammifère (Kucherlapati et Smith, 1988). Le dernier type de recombinaison, soit la transposition, est un processus de réarrangement dans lequel les séquences d'ADN sont déplacées d'un endroit à un autre dans le génome. Rencontré chez les eucaryotes et chez les procaryotes, ce phénomène s'effectue généralement par étapes grâce à une transposase codée par la séquence mobilisée elle-même, c'est-à-dire le transposon. Une des similitudes entre les éléments transposables eucaryotiques et procaryotiques est que la transposition sur un nouveau site génère une courte séquence répétée au site d'intégration. Bien que les transposons puissent conférer à leur hôte un avantage sélectif, tel la résistance aux antibiotiques, ils engendrent parfois au site de l'insertion une inversion, une délétion et voire un remaniement plus complexe.

Ces mécanismes de recombinaison sont étudiés depuis plusieurs années déjà à l'aide de différents systèmes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (levures, plantes, mammifères). Parmi ces systèmes, certains permettent une étude de la recombinaison au sein du génome cellulaire (recombinaison intra-chromosomique ou inter-chromosomique) où les séquences recombinogènes font parties du matériel génétique de l'hôte, d'autres reposent sur l'étude de la recombinaison extra-chromosomique utilisant des substrats plasmidiques ou épisomiques capables de recombiner en dehors des chromosomes. Les différentes expérimentations ont donné lieu

à une somme importante d'information qui a permis l'élaboration de divers modèles de recombinaison tel le réputé modèle de Holliday (1964) et celui de Meselson et Radding (1975). Ces deux modèles de recombinaison génétique ont, comme événement d'initiation, une cassure simple brin qui permet la génération d'un hétéroduplex d'ADN. Ces modèles ne permettaient cependant pas d'expliquer certains aspects de la conversion génique chez les levures. Szostak et al. (1983) ont élaboré le modèle du "double-strand break repair" (DSBR) qui permettait d'expliquer plus facilement des phénomènes tels la conversion génique et la ségrégation méiotique. Alors que la structure intermédiaire contient deux jonctions d'Holliday, c'est l'initiation par cassure double brin qui confère à ce modèle son originalité.

La recombinaison génétique est un phénomène qui soulève encore beaucoup de questions, car la rareté relative de modèles d'étude limite quelque peu l'étendue du champ de recherche. Avec l'avènement de la thérapie génique, la recherche sur la recombinaison génétique prend une importance accrue. En effet, il est impérieux de bien comprendre les mécanismes et les conséquences de ce phénomène générateur de changements génétiques qui peuvent être permanents. Une meilleure compréhension du processus de recombinaison nous permettra d'élaborer des traitements adéquats et efficaces contre des maladies telles que le cancer, la fibrose kystique et certaines formes de diabète.

Dans le laboratoire du Dr. Bourgaux, la recombinaison homologue est étudiée dans la cellule de souris à l'aide du virus du polyome (Py).

## **B) Le virus du polyome (Py).**

Le virus du polyome fait partie de la famille des papovavirus. Ce petit virus (45 nm de diamètre) non-enveloppé a la capacité d'induire la formation de tumeurs chez la souris ainsi que d'autres rongeurs. La particule virale est constituée d'un génome d'ADN (figure 1) et de protéines. Son ADN double brin circulaire (5.3 Kpb) est complexé avec des histones cellulaires pour former un mini-chromosome d'organisation semblable à celle de la chromatine cellulaire. Le génome viral possède des éléments régulateurs importants que l'on retrouve, également dans l'ADN cellulaire eucaryote, parfois dans une forme moins achevée. Effectivement, ce génome possède une origine de réplication, des promoteurs de transcription (précoce et tardif), une séquence stimulatrice ("enhancer") de la réplication et de la transcription, ainsi que des signaux de polyadénylation des ARN messagers (ARNm). Les deux promoteurs positionnés dos-à-dos (figure 1) permettent l'expression successive et contrôlée des protéines précoces et tardives nécessaires à la multiplication du virus. Les ARNm précurseurs possèdent des séquences d'épissage alternatif permettant la synthèse des différentes protéines virales ((Tooze, 1980); figure 1). La région précoce code pour trois protéines : grand T (LT), moyen T (MT) et petit T (ST). Ces protéines sont essentiellement responsables de l'activation de la réplication du génome viral, de la transformation cellulaire et du passage en phase tardive du cycle viral. Bien que l'on détecte une faible quantité d'ARNm tardifs au début du cycle viral (12 premières heures), la stimulation de la transcription des gènes tardifs s'effectue plus tard dans le cycle (de 12 à 48 heures). Bien que les détails moléculaires du passage en phase tardive soient encore mal compris, la présence de grand T (LT) et la réplication, ou sa conséquence, l'accumulation de

## Figure 1. Organisation fonctionnelle du génome de Py

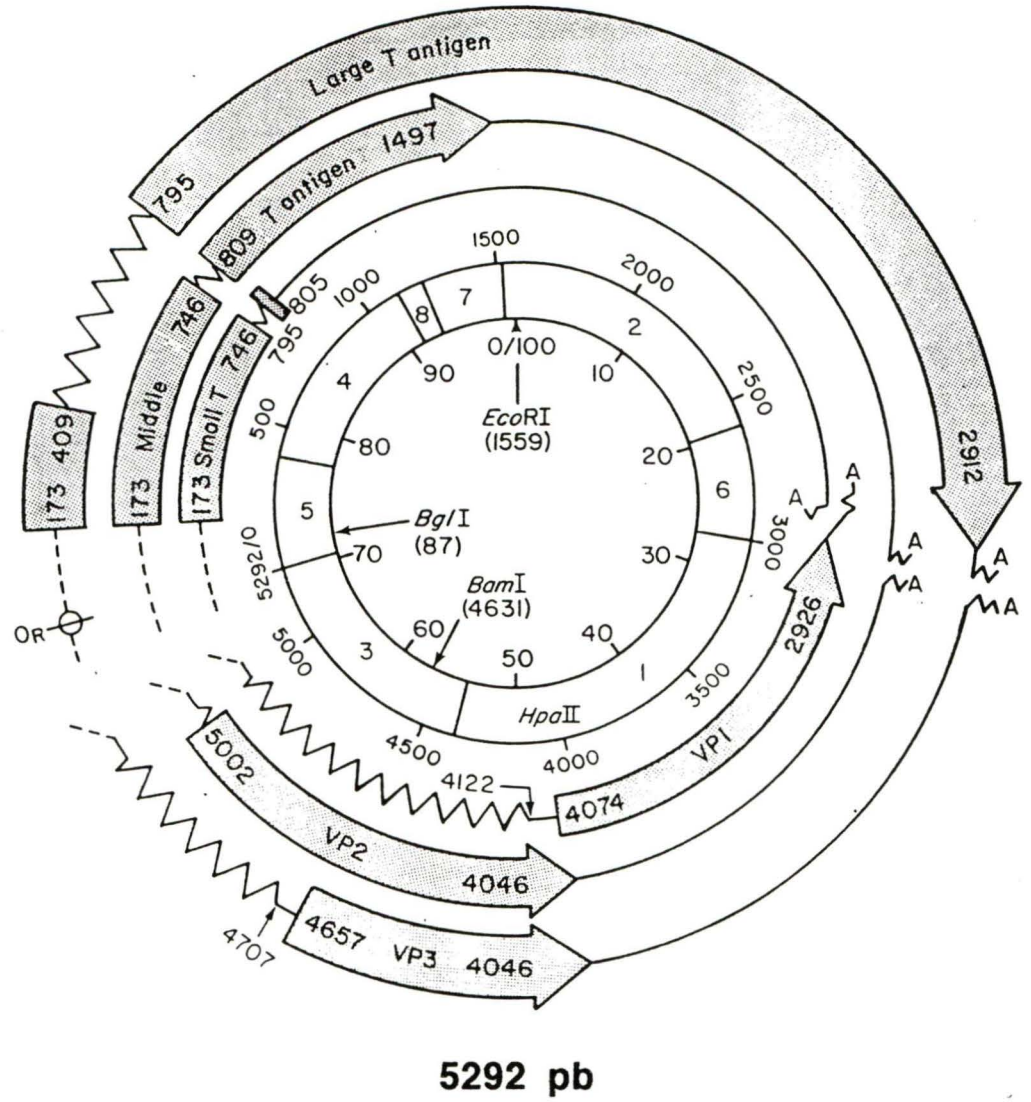
### A. Carte physique de Py

La carte circulaire du génome viral (souche A2) est divisée en 100 unités distribuées dans le sens horaire à partir du site *EcoRI* (0 /100). Le site de restriction *Hpa II* situé à 70.5 définit l'origine de réplication de l'ADN viral et correspond au début de la numérotation nucléotidique (0 / 5292), elle est aussi croissante dans le sens horaire (Griffin et al., 1981). De part et d'autre de l'origine de réplication, on retrouve les séquences codant pour les protéines précoces ainsi que pour les protéines tardives (boîtes grises fléchées). Les gènes précoces encodent les protéines grand T (LT), moyen T (MT) et petit T (ST), tandis que les gènes tardifs encodent les protéines de structure VP1, VP2 et VP3. À l'intérieur des flèches sont indiquées les coordonnées en nt des différentes portions codantes. Les lignes en zigzag représentent les séquences des ARNm qui sont éliminées par épissage et les lignes droites correspondent aux séquences non-épissées et non-traduites. Notez la présence des signaux de polyadénylation aux extrémités des deux régions codantes et représentés par de petits zigzag terminés par la lettre A. Les positions de quelques sites de restriction sont également indiqués sur cette carte (Tooze, 1980).

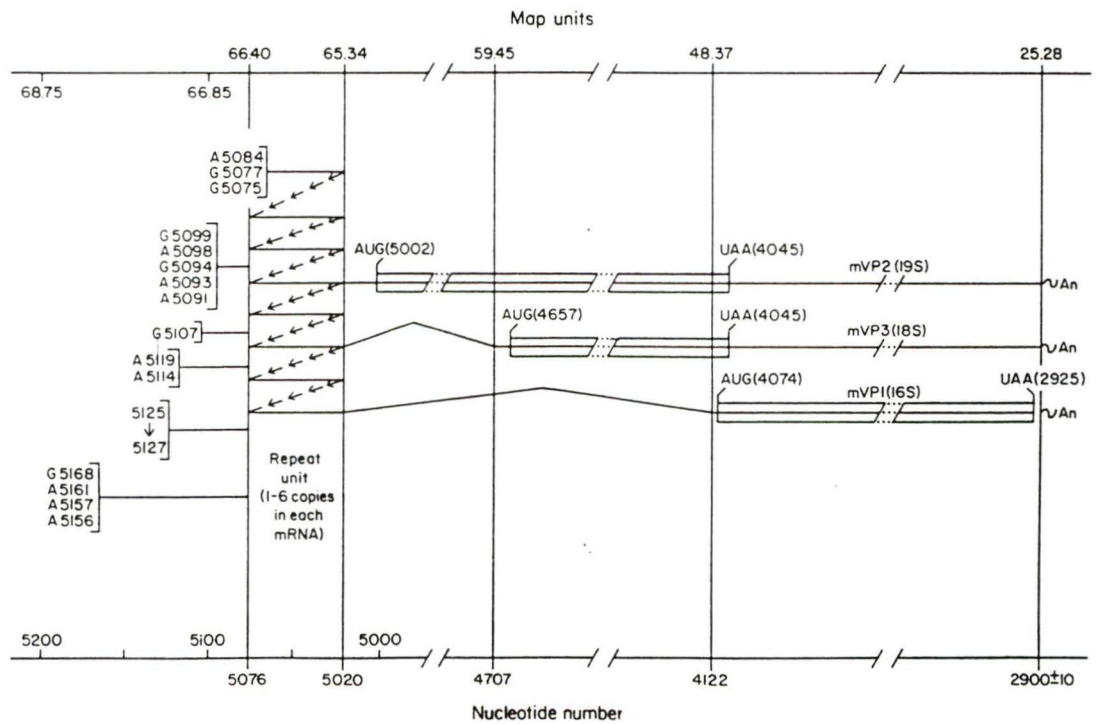
### B. ARN messagers de la région tardive de Py

Cette illustration représente essentiellement la façon dont les ARNm des gènes tardifs sont transcrits et épissés. Les boîtes blanches représentent la portion codante des ARNm tandis que les minces lignes horizontales représentent leur patron d'épissage. Transcrits d'un promoteur localisé dans la région 66.0 – 72.0 du génome, les ARNm primaires subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles avant d'arriver aux ARNm de 16S (VP1), 19S (VP2) et 18S (VP3) que l'on rencontre dans le cytoplasme (Tooze, 1980). Les portions transcrites de façon répétitives entre les nt 5076 et 5020 correspondent à des séquences exoniques non-codantes importantes pour les étapes d'épissage et pour la stabilité des ARNm (Barrett et al., 1995).

**A**



**B**





l'ADN viral semblent être des éléments importants de la transition de la phase précoce en phase tardive (Farmerie et Folk, 1984; Kern et al., 1986; Kern et al., 1987).

Les produits des gènes tardifs s'accumulent de façon plus importante après que la réplication du génome ait débuté. La région tardive code pour les trois protéines de capsid: VP1, VP2 et VP3, toutes trois nécessaires à l'assemblage et à la maturation du virion. VP1 est la protéine de capsid majeure. Elle est constituée de 385 a.a. pour un poids moléculaire de 45 Kda. Légèrement plus petites, VP2 et VP3 ont comme poids moléculaire 35Kda et 23Kda respectivement. Le cadre de lecture pour VP1 est décalé de celui de VP2 et VP3 et la séquence codant pour la partie N-terminale de VP1 chevauche celle spécifiant la partie C-terminale de VP2 et VP3 sur une longueur de 30 nt. Ces trois protéines tardives forment une capsid de symétrie icosaédrale contenant 360 copies de la protéine majeure VP1 et approximativement 30 copies de chacune des protéines mineures (VP2 et VP3). Une fois les ARNm traduits, et alors que les protéines subissent leurs modifications post-traductionnelles, les monomères de VP1 s'assemblent sous la forme de pentamères (Harrison, 1990; Liddington et al., 1991; Rayment et al., 1982). Correspondant aux sous-unités structurales de la capsid, chaque pentamère s'associe avec une seule copie de protéine mineure (VP2 ou VP3). Sous forme de complexes VP1/VP2 et VP1/VP3, les protéines de capsid migrent vers le noyau où se fera l'assemblage de la capsid. La portion C-terminale de VP1 assure les contacts interpentamériques qui maintiennent la structure de la capsid tandis que sa portion amino-terminale joue un rôle dans la liaison à l'ADN viral (Garcea et al., 1987; Leavitt et al., 1985; Moreland et al., 1991). La capsid achevée est constituée alors de 72 pentamères; 12 pentavalents aux sommets et 60 hexavalents au niveau des faces et arêtes

de l'icosahédre (Rayment et al., 1982). Dans la cavité axiale de chaque pentamère se trouve alors insérée une seule copie de VP2 ou de VP3, ancrée au pentamère de VP1 par une séquence de 40 nucléotides proche de son extrémité C-terminale (Barouch et Harrison, 1994).

Plusieurs rôles ont été attribués aux protéines de capside mineures. On sait que la présence de VP2 et de VP3 n'est pas nécessaire pour l'assemblage de VP1 en une particule semblable en tous points à une capside virale vide (Montross et al., 1991). Bien qu'il a été démontré *in vitro* que la présence des protéines mineures semble importante pour l'assemblage des virions complets (Moreland et Garcea, 1991), l'introduction de mutations qui affectent l'intégrité ou la production de VP2 et VP3 ne contribue qu'à diminuer le pouvoir infectieux des particules virales (Cole et al., 1977; Krauzewicz et al., 1990). On croit que les protéines de capside mineures contribuent à l'encapsidation du mini-chromosome durant l'assemblage des particules infectieuses du virus du polyome. On ne connaît cependant pas encore le mécanisme par lequel l'encapsidation du complexe ADN-histone s'effectue. Des analyses de diffraction aux rayons X de capsides vides ont permis de préciser la position de VP2 et VP3 à l'intérieur de la capside. Tel que mentionné précédemment, VP2 et VP3 se situent au centre des pentamères de VP1 tout en montrant une protubérance vers l'intérieure de la capside où se trouve l'ADN (Chen et al., 1998). On croit que par leur position et leur structure, les protéines tardives du polyome auraient un rôle de guide pour l'assemblage précis du complexe nucléohistone de la capside. Certaines études ont démontré que l'espacement moyen des nucléosomes sur la chromatine virale varie d'une étape à l'autre au cours du cycle viral. Cette redistribution des nucléosomes semble être menée par la fixation des protéines de

structure sur l'ADN viral à des moments bien précis de l'infection productive (Ambrose et al., 1990; Blasquez et al., 1986). Ces études ont conclu que le remaniement des nucléosomes par les protéines tardives apporte une forme de régulation de l'expression des gènes et prépare l'ADN à l'encapsidation. On pense également que VP2 aurait un autre rôle au niveau des stades précoces de l'infection. Lorsqu'on empêche la myristylation de VP2 en N-terminal par mutagenèse dirigée on remarque un délai dans la croissance virale (Krauzewicz et al., 1990). Une forme non-myristylée de VP2 semblerait nuire à une étape précoce de l'infection comme l'entrée de la particule ou bien l'ouverture de la capside lors de la libération de l'ADN viral (Krauzewicz et al., 1990; Paul et al., 1987). Plusieurs virus non-enveloppés possèdent des protéines myristylées (Chow et al., 1987; Clark et Desselberger, 1988; Nibert et al., 1991) et curieusement, elles ont toutes un lien avec le processus d'entrée de la particule virale dans la cellule.

### **C) Modèle RmI**

Lors d'une infection par Py, le génome viral peut s'intégrer de façon covalente dans l'ADN de la cellule hôte ou bien rester sous forme plasmidique. Il est probable que l'intégration du génome viral, en une position aléatoire ou quasi aléatoire dans le génome cellulaire, amène généralement l'état transformé chez les cellules semi-permissives. Il arrive parfois que ce génome viral, par un mécanisme encore mal connu, s'excise de l'ADN de la cellule hôte pour reprendre sa réplication. L'induction de l'excision peut se faire de façon spontanée ou peut être stimulée artificiellement. Dans le cas du mutant Py codant pour un grand T thermosensible, ts-A, il a été démontré que l'excision du génome viral peut être provoquée en transférant des cellules transformées de 39°C à 33°C (Vogt, 1970). À la température restrictive de 39°C, le génome viral reste sous forme intégré, et

il n'y permet donc pas la production de particules virales. Au contraire, lors d'un transfert à la température non-restrictive de 33°C, il y a excision du génome de Py et reprise du cycle de multiplication virale.

La molécule RmI (Figure 2A) provient d'une lignée cellulaire (lignée Cyp, (Bourgaux et al., 1978)) résultant de la transformation à 39°C d'une culture secondaire d'embryon de souris par un mutant thermosensible du virus de Py, ts P155 (Eckhart, 1969) ou P155. Les cultures de cellules Cyp sont uniques dans la mesure où après le passage de 39°C à 33°C elles montrent en 48 hres un effet cytopathogène massif indiquant l'amplification virale dans la plupart des cellules. Le mutant P155 intégré dans l'ADN des cellules Cyp et isolé à partir de la souche sauvage P16 (Diamond et Crawford, 1964) code pour une protéine grand T (LT) thermosensible résultant une transversion G → C au nucléotide 2658 (Gendron et al., 1988). P155 diffère cependant de la majorité des mutants ts précoces de Py (mutant tsa). Comme eux, il ne peut se répliquer à la température restrictive de 39°C (Eckhart et Dulbecco, 1974), mais à leur opposé, il peut transformer les cellules à cette température (Eckhart, 1969; Eckhart et Dulbecco, 1974).

Lorsque ces cellules Cyp sont transférées de 39°C à 33°C, il y a excision et accumulation dans la cellule d'ADN viral libre (Bourgaux et al., 1978; Delbecchi et al., 1981; Sylla et al., 1980). Différents clones Cyp ont été isolés et leur génome viral intégré a été cartographié (Chartrand et al., 1981). Dans le clone C12/a1 un phénomène particulier a été observé. Lorsque ce dernier est transféré de la température restrictive (39°C) à la température permissive (33°C), il y a accumulation non seulement de la

## Figure 2 Carte physique de RmI et du produit de recombinaison P155

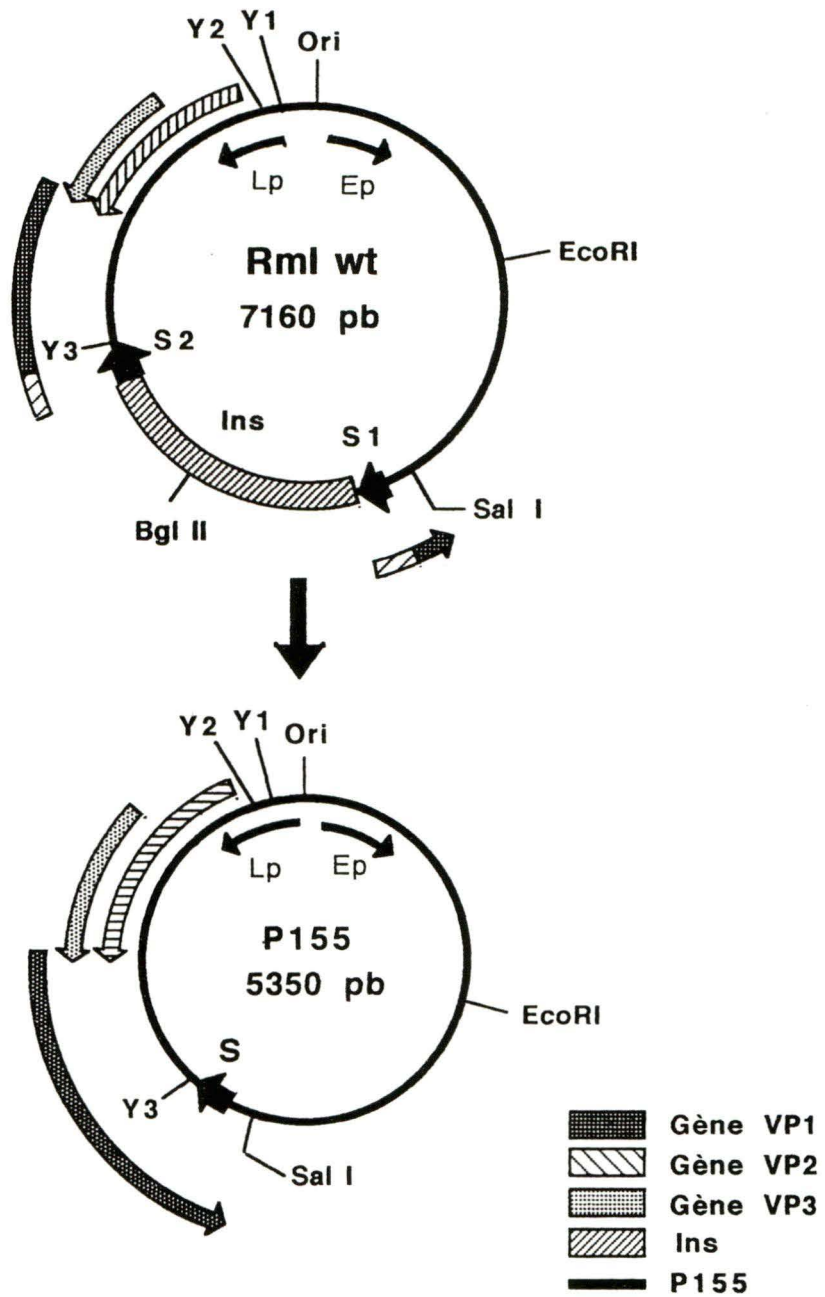
### A. Carte physique de RmI et de P155

RmI est une molécule circulaire hybride de 7.1 Kpb composée de 1628 pb d'ADN de souris (Ins, boîte hachurée) insérées dans la région codante tardive de l'ADN de Py (ligne noire). Des répétitions virales directes de 182 pb (nt 3092 à 3273) se retrouvent de part et d'autre de l'Ins (répétitions S1 et S2 représentées par des têtes de flèches). La région intergénique comprend l'origine de réplication (Ori) ainsi que les deux promoteurs précoces (EP) et tardif (LP). Le sens de la transcription est démontré par les flèches situées près de l'origine (face intérieure du cercle). Le positionnement des gènes VP1, VP2 et VP3 est également représenté par des flèches dans la région tardive du génome viral (face extérieure du cercle). Lorsqu'il y a recombinaison entre les répétitions S, RmI est converti en un génome viral de longueur unitaire P155. Le produit réciproque, IR (issue de l'excision de l'Ins et d'une répétition S), ne possédant pas d'origine de réplication ne peut être amplifié et par le fait même détecté. Les sites de liaison au facteur de transcription YY1 (Y1, Y2 et Y3) sont positionnés sur la figure. Notez que le site de liaison Y3 chevauche la jonction entre l'ADN viral et la répétition S2. Le site de restriction *Sal I* (nt 2962) situé dans la région codante tardive est utilisé pour le clonage du vecteur plasmidique utilisé dans cette étude.

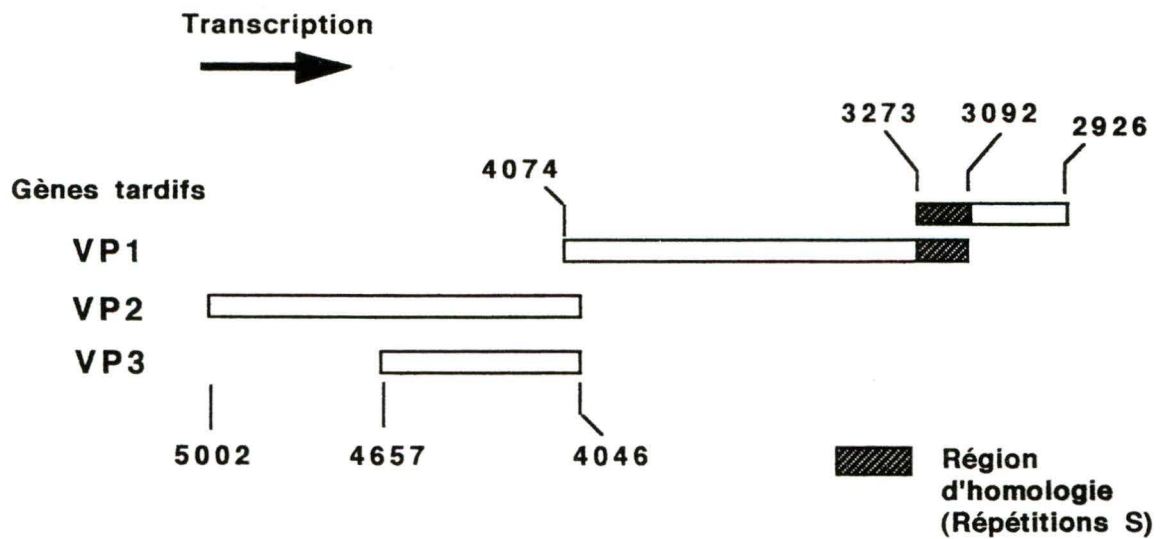
### B. Région codante tardive de Py

Ce schéma représente les portions codantes pour les gènes tardifs encodant VP1, VP2 et VP3. Les numéros inscrits au début et à la fin des portions codantes représentent les positions en nt des codons d'initiation et de terminaison des différents gènes tardifs. Notez la position des répétitions S au niveau du gène VP1. Ce n'est seulement que par une recombinaison entre les répétitions S que la protéine VP1 peut être exprimée totalement.

**A**



**B**



molécule P155, mais également de la molécule RmI selon un rapport RmI : P155 de 20 : 1 (Sylla et al., 1980). RmI est une molécule circulaire hybride produite par recombinaison site-spécifique entre l'ADN viral intégré et les séquences cellulaires flanquantes (Sylla et al., 1984). Cette molécule est constituée de 1.03 copie du génome viral P155 interrompu au nt 3273 par une insertion de 1628 pb d'ADN cellulaire de souris (Ins). Cette insertion possède à ses extrémités une répétition inversée imparfaite de 7 pb qui est prolongée par une répétition directe d'une séquence virale longue de 182 pb s'étendant des nt 3092 à 3273. Les éléments de cette duplication sont appelés répétitions S1 et S2 ou S (Bourgau et al., 1982; Bourgau et al., 1990). Notez que par sa position, l'Ins interrompt la séquence codant pour la protéine tardive majeure VP1 (nt 4074 à 2926, Figure 1). Il doit alors avoir recombinaison entre les répétitions S pour qu'un VP1 de pleine longueur puisse être synthétisé (figure 2B).

Piché et Bourgau (1987) ont montré que RmI, lorsque transfecté dans des cellules normales de souris (3T6), est une molécule hautement infectieuse à 33°C par le fait qu'elle génère de l'ADN viral de longueur unitaire (P155) par recombinaison intramoléculaire entre les répétitions S. Pour quantifier l'efficacité avec laquelle la conversion RmI → P155 s'effectue, on se basa sur des observations montrant que RmI, probablement en raison de sa taille, n'est pas encapsidable (Sylla et al., 1980). La capacité du produit de recombinaison P155 à produire des plaques virales a alors permis de montrer clairement que le taux de recombinaison est de loin supérieur à ce qu'on attendait pour une recombinaison impliquant une duplication de 182 pb. Effectivement, on estime un taux de recombinaison de 100 à 800 fois supérieur à ce que d'autres chercheurs ont observé pour des homologies de taille comparable (Rubnitz et Subramani,

1984). Des travaux antérieurs sur la recombinaison homologue chez SV40 ont suggéré que l'homologie minimale nécessaire pour une recombinaison efficace était de 200 pb pour de l'ADN circulaire (RubnitzetSubramani, 1984) et 131pb ou moins pour de l'ADN linéaire (Roth et Wilson, 1985).

Par son efficacité et sa rapidité de conversion en P155, RmI est donc un excellent modèle d'étude pour les phénomènes de recombinaison. RmI et P155 étant très bien caractérisées, il devient relativement facile de modifier génétiquement leur ADN. Étant dépendant de la machinerie enzymatique cellulaire pour des réactions telles que la réplication, la transcription, la réplication et la recombinaison, l'effet des modifications effectuées sur le génome viral nous éclaire donc sur les comportements fonctionnels de ces réactions.

#### **D) La recombinaison chez RmI**

Des essais de transfection de dimères circulaires du virus SV40 ont été effectués dans le but d'étudier les produits d'une recombinaison homologue. Par ces expérimentations, on s'est aperçu que l'événement de recombinaison ne donnait pas deux, mais un seul génome viral monomérique (Wake et Wilson, 1980). La recombinaison de RmI amenait-elle P155 seul ou bien P155 et son produit réciproque IR ? Pour répondre à cette question, Piché A. (1987) inséra dans l'Ins une origine de SV40 permettant au produit réciproque de se répliquer. Les résultats obtenus démontrèrent qu'il y avait, contrairement aux études de Wake et al. (1980), production de produits homogènes, soient P155 et le réciproque IR proposant alors une recombinaison plutôt site-spécifique (Piché et Bourgaux, 1987).



Dans le but de cerner une région ou un site important au niveau de la recombinaison, on décida d'allonger l'homologie de séquence chez la molécule RmI. Cette idée provenait du fait que tous les modèles proposés pour la recombinaison homologue assument que l'homologie de séquence joue un rôle dans la génération du complexe synaptique dans lequel le "crossover" va se produire (Holliday, 1964; Holliday, 1974; Meselson et Radding, 1975; Szostak et al., 1983). L'ajout de séquences homologues autres que les deux répétitions S engendre dans le système RmI une compétition pour la région, ou le site, de recombinaison. On observa que des ajouts de 1 à 2 Kpb aux répétitions S de 182 pb engendraient une recombinaison plus efficace chez ces constructions que chez RmI. Le "crossing-over" survenait cependant préférentiellement à l'intérieur ou à proximité des répétitions S plutôt que sur des sites distribués aléatoirement à travers les régions d'homologie. Et pourtant, aucun site ou séquence reconnu jusqu'alors comme étant impliqué dans la recombinaison site-spécifique n'a été identifié chez les répétitions S, si ce n'est qu'elles doivent être correctement positionnées en rapport à l'origine de réplication. On croit qu'elles posséderaient une ou des séquences qui permettraient la formation d'un complexe synaptique adéquat pour la recombinaison intramoléculaire (Bourgau et al., 1990).

Ces observations soulèvent beaucoup de questions sur le mécanisme par lequel P155 est généré à partir de RmI. S'agit-il d'un mécanisme de recombinaison homologue ou bien site-spécifique ? Même l'identification de la portion minimale nécessaire aux répétitions S pour engendrer la recombinaison n'a pu mettre en évidence un site privilégié (ou site-spécifique) où se ferait l'échange génétique. Cependant, des essais de délétion ont permis tout de même d'identifier qu'une homologie résiduelle de 45 à 55 pb des

répétitions S permet de générer du P155. Une plus grande diminution de l'homologie engendre des produits de recombinaison illégitimes plutôt que de l'ADN de longueur unitaire (Frappier et al., 1990).

Toutes ces études cherchant à cibler la contribution des répétitions S dans la recombinaison intramoléculaire n'ont pu définir précisément le type de recombinaison sous lequel la conversion de RmI s'effectue. Cependant, elles ont permis de mieux comprendre le comportement et le processus par lequel cette recombinaison s'effectue. Par ces nombreux résultats nous avons compris que la recombinaison semble débiter par un alignement des séquences homologues pour ensuite arriver au "crossing over" entre les répétitions S. De façon générale, nous parlerons alors de recombinaison homologue hautement efficace ou, tout simplement, de recombinaison entre les répétitions S, ou SR.

#### **E) Recombinaison et transcription**

Comme il a été mentionné précédemment, Bourgaux et al. (1990) ont démontré que la recombinaison serait dépendante de la position des répétitions S en relation avec l'Ori. Dans le système RmI, la conversion du substrat en produit s'effectue à haute fréquence et ce possiblement par un procédé débutant à l'origine et parcourant l'ADN tel la réplication ou la transcription. Il a été démontré qu'une délétion du promoteur viral précoce ou une inversion du promoteur viral tardif réduit considérablement la fréquence de recombinaison entre les répétitions S (Nault et al., 1994). Ceci suggérerait que la transcription bidirectionnelle, démarrant au niveau de la région intergénique, favoriserait la recombinaison intramoléculaire. Bien que la relation entre la transcription et la recombinaison intramoléculaire a déjà été observée pour d'autres systèmes (Ikeda et

Matsumoto, 1979; Voelkel-Meiman et al., 1987; Schlissel et Baltimore, 1989; Stewart et Roeder, 1989; Thomas et Rothstein, 1989; Nickoloff et Reynolds, 1990) beaucoup de questions concernant le mécanisme restent sans réponse. Cependant, par les résultats obtenus (Nault et al., 1994) chez RmI, on croit que ces deux processus seraient liés de façon mécanique. La découverte d'un troisième site de fixation du facteur de transcription YY1 à proximité de la répétition S2 nous a permis d'orienter nos recherches. Ciblé par Daniel Gendron (Gendron et al., 1996), Y3, vient s'ajouter aux sites Y1 et Y2 précédemment découverts (Hirano et Iwakura, 1990; Martelli et al., 1996). Mentionnons également que les trois sites sont localisés dans la région tardive du génome viral de Py (figure 2A). Ce qui est très particulier avec le site Y3 c'est qu'il se retrouve aux coordonnées 3270 à 3278 soit au début de la séquence de la répétition S2. Bien que nous n'avons pas identifié de rôle pour Y3 au niveau de la transcription, il a cependant été démontré par mutagenèse, que l'intégrité du site Y3 est essentielle pour la recombinaison entre les répétitions S in vivo (Gendron et al., 1996). Effectivement, une substitution ponctuelle introduite dans le site Y3 ne modifiant pas la séquence primaire de VP1 et n'ayant aucune influence sur la séquence homologue de la répétition S, mais abolissant la liaison à YY1, inhibe totalement la recombinaison chez RmI. Nous croyons que cette abolition de la recombinaison pourrait indiquer que le facteur YY1 permettrait de recruter la machinerie de transcription au site Y3. Ce recrutement engendrerait certains changements topologiques de l'ADN viral ce qui stimulerait le processus de recombinaison. L'ADN viral étant également localisé près de la matrice nucléaire, serait sous l'influence d'un environnement riche en activités enzymatiques de toutes sortes. Les conditions nécessaires au "crossing-over" seraient alors rassemblées et la recombinaison entre les répétitions S aurait donc lieu. Une autre explication serait

l'inhibition de l'élongation de la transcription chez les molécules où YY1 ne peut se fixer au site Y3. Ceci réprimerait la synthèse des protéines tardives, notamment celle de VP1. L'absence de ces protéines structurales, généralement en contact étroit avec l'ADN de Py, inhiberait alors possiblement la recombinaison.

#### **F) Recombinaison et protéines tardives (VP1, VP2 et VP3)**

L'origine de ce projet de maîtrise découle de l'hypothèse mentionnée précédemment qui suspecte l'implication des protéines tardives au niveau de la recombinaison de RmI. Les protéines tardives du virus du polyome, bien qu'elles gagnent en popularité, font l'objet de peu d'études présentement. Contrairement à leurs cousines du côté précoce soit grand T, moyen T et petit T, les multiples rôles soutenus par les protéines tardives sont relativement moins bien définis. Des travaux antérieurs du laboratoire d'accueil ont été essentiellement basés sur la protéine tardive majeure, soit VP1. Cette protéine possède, contrairement aux protéines tardives mineures, un domaine de liaison à l'ADN. Il va sans dire que la présence de VP1 est donc essentielle pour que VP2 et VP3 puissent être transportées efficacement au noyau et ainsi accomplir leurs rôles. Il devenait alors nécessaire de bien comprendre le comportement et de cerner le ou les rôles de VP1 au niveau de la recombinaison avant d'analyser l'implication des protéines mineures.

Chez RmI la séquence de VP1 se trouve interrompue par l'Ins, l'analyse théorique de la séquence de RmI et de l'insertion d'ADN génomique a permis d'identifier la possibilité de l'expression d'une protéine VP1 tronquée : VPX. Bien que ciblée théoriquement, l'existence de VPX n'a été que démontrée tout dernièrement. VPX inclut les 328 acides aminés de l'extrémité N-terminale de VP1, plus 9 acides aminés encodés

par l'insertion (Ins) d'ADN génomique de souris. L'expression de cette protéine VP1 tronquée cesse lorsque la molécule RmI se recombine pour donner un ADN de longueur unitaire (Py) puisque la séquence codante de VP1 est reconstituée suite au "crossing-over" entre les répétitions S1 et S2. Notre laboratoire a isolé la séquence codante de VPX pour ensuite l'exprimer dans un vecteur baculoviral. La protéine ainsi produite a été purifiée sur colonne d'immuno-affinité pour ensuite être soumise à une électrophorèse sur gel d'acrylamide. La révélation au nitrate d'argent a démontré l'existence d'une protéine de 39 Kda, poids théorique attendu pour une protéine VP1 tronquée de 46 a.a. L'autre indice de l'existence de VPX a été obtenu suite à l'introduction du gène EGFP dans l'Ins, en aval de VPX. L'expression d'une protéine de fusion VPX-EGFP a pu être visualisée par fluorescence. La transfection de ces recombinants démontra non seulement la fluorescence, mais une localisation nucléaire, tel qu'attendue, des protéines de fusion VPX-EGFP. Ces résultats démontrent qu'il y a effectivement expression des gènes viraux tardifs après la transfection de RmI et qu'en plus, la translocation au noyau semble s'effectuer pour VPX comme elle s'effectue pour VP1. Possédant tous les acides aminés impliqués dans l'interaction avec les protéines VP2 et VP3 (Chen et al, 1998), il demeure également plausible que VPX puisse s'associer aux protéines tardives mineures pour en assurer le transport au noyau. VPX, qui possède le domaine de liaison à l'ADN caractéristique de VP1, pourrait alors assurer les contacts étroits entre l'ADN de RmI et les protéines tardives.

Quels sont les rôles des protéines tardives au niveau de la recombinaison? Des travaux de notre laboratoire ont démontré, par l'introduction de mutations en N-terminal et en C-terminal de la séquence codante de VPX, que cette protéine tronquée est capable

de remplir au moins quelques fonctions de régulation reliées normalement à VP1 au niveau de la recombinaison. Ses résultats indiquent clairement qu'un site Y3 intact est effectivement requis en cis dans la recombinaison entre les répétitions S1 et S2 et qu'une protéine tardive VPX agit en trans dans cette même recombinaison.

La présente étude a donc été centrée sur l'implication éventuelle de VP2 et de VP3 dans la recombinaison. En suspectant que VPX peut assurer le transport au noyau de ces protéines mineures avant la recombinaison, le contact entre VP2 et VP3 d'une part, et l'ADN d'autre part devrait s'effectuer. Notre travail a consisté à introduire des codons non-sens en des points stratégiques des gènes codant pour VP2 et VP3. La présence de ces codons non-sens a effectivement résulté en la disparition de la production des protéines pleine longueur, ce qui nous a permis d'analyser leurs rôles au niveau de la recombinaison intramoléculaire. Plus spécifiquement, trois mutations dénommées VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 introduisent chez RmI un codon non-sens aux positions 4684, 4613 et 4078 respectivement. Ces trois modifications, affectant pourtant les protéines mineures de façon différente, ont démontré leur capacité à inhiber la recombinaison de façon semblable. À la lumière de ces résultats et des résultats obtenus par l'étude sur VP1, certaines hypothèses ont été élaborées sur la façon dont l'apport des protéines de structure agit sur la recombinaison de RmI.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **A) Clonage moléculaire**

#### **1. Traitement enzymatique des molécules d'ADN**

Les endonucléases de restriction sont utilisées selon les conditions réactionnelles recommandées par les fabricants (Promega, Pharmacia, Amersham/USB, Boehringer/Roche)

Certains fragments d'ADN ont dû être déphosphorylés avant l'étape de ligation. Toutes les déphosphorylations ont été effectuées avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau ( CIAP de Promega). Son utilisation a été effectuée selon les recommandations du fabricant.

Toutes les étapes de ligation inter- ou intra-moléculaire des fragments d'ADN ont été effectuées avec la T4 ADN ligase (USB) selon les conditions suggérées par les fournisseurs. Les incubations ont été effectuées pendant 16 heures à 16°C.

#### **2. Électrophorèse**

Les molécules d'ADN sont séparées sur gel d'agarose horizontal (agarose USB 0,8 à 2,0%) dans un tampon TAE 1X ( Tris-acétate 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,0). 0.5µg/ml de bromure d'éthidium est incorporé au gel. L'ADN, avant d'être déposé sur gel, est mélangé avec 1/10 volume de tampon de dépôt (sucrose 40%, bleu de bromophénol

0,25%, xylène cyanol 0,25%, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). Les marqueurs de taille séparés d'1Kpb et les marqueurs de taille supérieure (Gibco BRL, Life technologies) ont été employés selon les recommandations des fabricants. Après l'électrophorèse, le gel est photographié sous lumière U.V. (254 nm) à l'aide d'une caméra 35 mm et d'un système vidéo *speedlight* de Lighttools Research.

### **3. Isolement de fragments sur gel préparatif**

Les fragments d'ADN à purifier sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose fondant 0,8 à 2,0 % ( Agarose *Nusieve* GTG, FMC bioproducts ou BRL). La portion d'agarose contenant le fragment à purifier est extraite de reste du gel pour être ensuite liquéfiée à 68°C. L'ADN est recueilli et élué sur une mini-colonne de résine *Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps* de Promega, selon les recommandations du manufacturier.

### **4. Transformation bactérienne et sélection des recombinants**

La souche DH5 $\alpha$  de *E.coli* est rendue compétente par la technique au RbCl<sub>2</sub> (Hanathan, 1983) et est utilisée dans la totalité des clonages. Les DH5 $\alpha$  compétentes sont transformées selon le protocole proposé par King et Blakesley (1986). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu nutritif (2YT ou LB, (Maniatis et al., 1989)) contenant 1,4% d'agar ainsi que 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline ou 30  $\mu$ g/ml de kanamycine tout dépendant du type de résistance que le plasmide confère. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant toute une nuit.



## 5. Amplification et purification des plasmides

Les colonies obtenues sur pétris sont repiquées etensemencées dans 5ml milieu de culture (LB, 2YT, (Maniatis et al., 1989)). Une portion du milieu de culture ainsi obtenu est ensuite soumis à une extraction plasmidique ("boiling lysis", (Holmes et Quigley, 1981)). Pour la préparation de plus grandes quantités d'ADN, on ensemence environ 500 ml de milieu et on purifie l'ADN avec la trousse *Magic<sup>TM</sup> Maxipreps DNA purification system* de Promega, selon les recommandations fournies par le fabricant.

## 6. Amplification de l'ADN par PCR

L'appareil PCR utilisé est le *Programmable thermal controler PTC 100* de Mount Jersey Research Inc. L'ADN est amplifié (Saiki et al., 1985) à l'aide de l'ADN polymérase *Pwo* de Boehringer Mannheim. La quantité d'ADN matrice est normalement de 1ng, mais peut variée sans toutefois dépasser 10ng. Les programmes utilisés pour les étapes d'amplification sont basés sur les cycles suivants :

Cycle 1	1 min. 30 sec. de dénaturation à 94°C 1 min. d'hybridation à 55°C 1 min. d'élongation à 72°C	
Cycle 2 à 29	1 min. 30 sec. de dénaturation à 94°C 1 min. d'hybridation à 55°C 1 min. à 2 min. d'élongation à 72°C	(Selon la taille du fragment)
Cycle 30	1 min. 30 sec. de dénaturation à 94°C 1 min. d'hybridation à 55°C 10 min. d'élongation à 72°C	
Finale	15 min. à 25°C Maintenir à 4°C	

Les amorces utilisées dans les réactions PCR sont à une concentration de 0.5 pmoles /  $\mu$ l et sont synthétisées à notre département à l'aide de l'appareil *Gene Assembler Plus* de Pharmacia / LKB ou sont commandées chez Gibco BRL.

## **7. Technique de séquençage**

La méthode enzymatique de marquage aux di-déoxynucléotides est utilisée (Sanger et al., 1977) pour le séquençage des molécules d'ADN. La trousse commerciale *T7 sequencing*™ Kit de Pharmacia a été utilisée selon les recommandations fournies. On emploie un ratio amorce : matrice double brin de 15 :1 . Ces réactions de séquence sont effectuées avec l'isotope  $\alpha$ -<sup>35</sup> S dATP d'Amersham. La préparation d'un gel d'acrylamide 4% d'une épaisseur croissante ainsi que l'électrophorèse sont effectuées selon le protocole du système de séquençage MacroPhor LKB 2010 de LKB. Après deux lavages de 30 minutes avec une solution d'acide acétique 10% et de méthanol 10%, le gel d'acrylamide est séché et autoradiographié à température pièce avec un film de type *Hyperfilm*™MP (35x43cm) d'Amersham.

## **B) Essais de recombinaison**

### **1. Cellules**

Deux types de lignées cellulaires permissives pour le virus Py ont été utilisées pour les transfections : les 3T6-Swiss albinos et les Scop-T<sub>1</sub>, toutes deux fibroblastes de souris transformés. Cette dernière lignée, dérivée de cellules C127, produit de façon constitutive les protéines précoces de Py (Rautmann et al., 1982). Vingt-quatre heures précédant la transfection, les cellules sont étalées sur des pétris de 100 mm en présence

de milieu DMEM (Dulbecco et Freeman, 1959) additionné de 10% de sérum de veau fœtal ("SVF") et 1% fongizone et incubées à 37°C en présence de 10% CO<sub>2</sub>.

## **2. Préparation de l'ADN avant la transfection**

Les molécules de type P155 et RmI possèdent un vecteur plasmidique modifié (voir figure 3) dérivé de pBR322. Ce vecteur pNN est excisé des molécules par l'enzyme *Sall* (site de clonage) avant la transfection. L'ADN ainsi traité est dilué à 10 µg/ml pour ensuite être recircularisé par ligation intra-moléculaire. Le produit de ligation peut être utilisé directement pour les transfections comme dans le cas des transfections au DEAE-dextran ou bien concentré par précipitation comme c'est le cas pour les transfections au D.O.S.P.E.R. (agent liposomale cationique).

## **3. Transfection**

DEAE-dextran : Les cellules (3T6 ou Scop-T<sub>1</sub>) sont transfectées à une confluence de 60-70% selon la méthode de Sussman et Milman (1984). Trois modifications ont été apportées au protocole.

- 1) Le DEAE-dextran utilisé est de 500 000 g/mol (Pharmacia Fine Chemicals).
- 2) Le DMEM est tamponné avec du TRIS à 0.05 M.
- 3) Une seule période de 3hres d'incubation à 10% de CO<sub>2</sub> précède le choc au DMSO.

D.O.S.P.E.R. : Cet agent de transfection constitué de liposomes cationiques est fourni par Boehringer-Mannheim. Les cellules sont transfectées à une confluence de 60-

80% tel que suggéré par le fabricant. Deux  $\mu\text{g}$  de DOSPER /  $\mu\text{g}$  d'ADN total est utilisé pour la transfection. Le protocole a été modifié pour des transfections sur pétris de 100mm suivant les proportions recommandées.

Les temps d'incubation des cellules transfectées ne dépendent cependant pas du type d'agent de transfection. Généralement, les cellules transfectées au P155 sont récoltées après 2 jours d'incubation à 37°C, CO<sub>2</sub> 10%, et dans du DMEM additionné de 7.5% de SVF. Tandis que les cellules transfectées avec RmI sont récoltées après 3 jours d'incubation à 37°C, CO<sub>2</sub> 10% et également dans du DMEM avec 7.5% de SVF. En ce qui concerne les essais de co-transfection avec les vecteurs d'expression et les hémagglutinations, les temps de récolte peuvent varier (voir Résultats et légendes des figures).

#### **4. Extraction de l'ADN de faible poids moléculaire**

L'ADN de faible poids moléculaire est extrait des cellules selon la technique décrite par Hirt (1967). Deux extractions phénol : chloroforme (1:1) sont effectuées sur les échantillons pour les déprotéiniser. L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol, séché dans un appareil *Speed Vac Concentrator* (Savant) et resuspendu dans du TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), à raison de 40 $\mu\text{l}$  par pétri, donc par échantillon. Un quart de pétri, soit 10 $\mu\text{l}$ , est généralement utilisé pour le traitement enzymatique précédant la migration sur gel d'agarose. La digestion enzymatique s'effectue à l'aide d'endonucléases de restriction appropriées (voir Résultat et légende des figures) en présence de 10 $\mu\text{g}$  de *Rnase* et de *DpnI*. L'endonucléase *DpnI* est utilisé pour cliver

l'ADN méthylé par l'activité *dam I* de *E.coli*. Ainsi, seulement l'ADN qui s'est répliqué dans les cellules eucaryotes ne sera pas fragmenté par *DpnI*.

## 5. Buvarpage de type Southern

L'ADN digéré par des endonucléases de restriction est déposé sur gel d'agarose 1% ne contenant pas de bromure d'éthidium. L'ADN, une fois séparé, est transféré sur une membrane de nylon *Hybond-N<sup>+</sup>* (Amersham) à l'aide d'un appareil *LKB VacuGene* (Pharmacia/LKB n°2016) sous une pression de 50 cm H<sub>2</sub>O. Le transfert alcalin utilisé ici débute par une dépurination de l'ADN pendant 20 minutes avec une solution de dénaturation de HCl 0,25N. Le transfert se poursuit pendant une heure dans une solution de dénaturation constituée de NaCl 1,5M et NaOH 0,5N. Une fois le transfert terminé, la membrane est neutralisée pendant une minute dans une solution de SSC 5X (NaCl 0,75M, citrate de sodium 0,075M).

## 6. Préhybridation et hybridation

La préhybridation et l'hybridation de l'ADN transféré s'effectuent selon la technique de van der Ploeg et Flavell (1980), en tenant compte des modifications apportées par Chartrand et al. (1981). Une fois l'hybridation terminée, les membranes sont lavées deux fois pendant 30 minutes à 68°C avec du SSC 2X contenant 0,1% de SDS. Deux autres lavages de 30 minutes sont effectués dans du SSC 2X sans SDS. On assèche les filtres sous une lampe *Flood* de 300 watts pendant environ 15 à 20 minutes. Les filtres sont ensuite exposés à -80°C contre les films *Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP* (Amersham) entre deux écrans intensifiants (Cronex par Speed, Dupont). Les autoradiogrammes sont développés à l'aide d'un appareil Kodak RP X-OMAT Processor.

## 7. Mesure densitométrique

Les autoradiogrammes obtenus sont digitalisés à l'aide de l'appareil Umax vista-S6E de Umax data systems inc. L'image informatisée ainsi obtenue est analysée à l'aide du programme NIH image 1.61 / 68K. Les valeurs numériques provenant de l'intégration sous l'aire de la courbe de densité sont alors utilisées pour effectuer les rapports des précurseurs / produits (Voir section Résultats).

## 8. Marquage de l'ADN *in vitro*

La technique employée est celle décrite par Feinberg et Vogelstein (1983). La trousse *Random Labelling* d'Amersham (RPN 1601Y) est utilisée pour produire la sonde radio-marquée (fragment Ori allant des nt 4686 à 2188 de Py). L'ADN à marquer est dénaturé par ébullition pendant 2 minutes avant d'être mis en contact avec un mélange d'amorces hexanucléotidiques de séquences aléatoires. Un allongement des amorces liées est ensuite effectué par le fragment *Klenow* de l'ADN polymérase I de *E.coli* pendant 1 heure à 37°C. Le marquage s'effectue par l'incorporation d' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham ou NEN, >3000 Ci/mmol).

L'activité spécifique de la sonde est déterminé par précipitation d'un aliquot sur filtre Whatman GF/A avec de l'acide trichloroacétique 10%, suivie d'un rinçage à l'éthanol 95%. Le comptage se fait dans du liquide à scintillation Ecolume<sup>TM</sup> (ICN) à l'aide d'un compteur à scintillation Beckman LS50 . On obtient habituellement une activité spécifique de l'ordre de  $5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  d'ADN.

Lors des migrations de nos échantillons sur gel d'agarose, nous ajoutons également une échelle de 1 Kpb (Gibco BRL, Life technologies) radiomarquée. L'échelle froide, ne pouvant être reconnue par notre sonde, doit être radiomarquée pour pouvoir être détectée sur l'autoradiogramme. Les fragments d'ADN constituant l'échelle possèdent des bouts cohésifs créés lors de la fabrication par digestion endonucléolytique. On effectue donc un remplissage des bouts cohésifs par le fragment *Klenow* de la DNA pol.I de *E.coli*. Le mélange réactionnel contient les quatre deoxynucléotides triphosphates, dont seule la deoxycytidine triphosphate est radiomarquée en  $\alpha$  par du  $^{32}\text{P}$ . Une quantité de  $4 \times 10^4$  cpm de l'échelle radiomarquée déposée sur gel est suffisante pour être détectée après moins de 5hres d'autoradiographie.

## **9. Essais de complémentation**

N'existant pas de protocole préétabli pour nos essais de complémentation, une gamme de facteurs régissant les transfections ont été modifiés afin d'adapter la technique à nos expérimentations. Les molécules complémentées, c'est-à-dire celles qui possèdent les modifications VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2, ont toujours été transfectées à  $5\mu\text{g}$  d'ADN, tandis que les quantités de vecteurs d'expression ont variées de  $10\mu\text{g}$  à  $0.01\mu\text{g}$  lors des essais de complémentation. Ces différentes gammes de concentration ont été nécessaires pour obtenir la quantité adéquate de vecteurs d'expression dans notre système. Suite à ces essais, la quantité adéquate de vecteur d'expression transfecté par p $\tau$ ri a été évaluée à  $5\mu\text{g}$ . Les molécules mutées et les vecteurs d'expression sont mélangés ensemble avec l'agent transfectant (DEAE-dextran, ou DOSPER) avant le contact avec les cellules (ScopT<sub>1</sub> ou 3T6). Les temps de récolte et les traitements des échantillons correspondent à ceux décrits précédemment.

## **C) Analyses protéiques**

### **1. Extraction des protéines**

Après une incubation de 2 à 4 jours à 37°C / CO<sub>2</sub> 10%, les tapis cellulaires sont rincés deux fois avec du PBS-A froid (+4°C) (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO<sub>4</sub> 10mM, KHPO<sub>4</sub> 1.8mM). Toujours maintenus sur la glace, on ajoute 1 ml / pétri 100mm de tampon de lyse RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1%, DOC Na 0.5%, SDS 0.1%, Tris 50mM pH7.5) additionné d'anti-protéases (Aprotinine 2µg/ml, PMSF 1mM, leupeptine 10µM, pepstatine A 1 µg/ml) qu'on laisse agir pendant 20 minutes. Le contenu du pétri est alors récolté au complet dans un eppendorf. On centrifuge ensuite l'échantillon 2 minutes à 13000 rpm de façon à faire culoter les fragments cellulaires. On récolte le surnageant qu'on congèle à -20°C jusqu'à utilisation.

### **2. Immunobuvardage**

Initialement développée par Towbin et al. (1979) ainsi que Burnette (1981), cette technique a été adaptée à nos besoins. À 10 µl des échantillons protéiques provenant de la lyse cellulaire ou bien des extractions virales on ajoute égale volume (10µl) de tampon de dépôt 2X (Tris-HCl 0.5M pH6.8, SDS 5%, Glycérol 20%, Bleu de bromophénol 0.2%, β-mercaptoéthanol 10%). On chauffe alors l'échantillon dans un bain à 100°C pendant 3 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés rapidement sur gel SDS /acrylamide de 10 ou 12% immergé dans un tampon d'électrophorèse (Tris 25mM, Glycine 250mM, SDS 0.1%). L'appareil utilisé pour les électrophorèses est le Hoefer mini-VE *Vertical Electrophoresis System* (Amersham ,pharmacia, biotech). Après migration, on procède au transfert des échantillons protéiques sur une membrane PVDF (Hybond-P RPNF-L ,



Amersham, pharmacia, biotech). Le transfert sous-marin s'effectue à 300mA, 1hre avec un appareil Hoefer mini-VE *Blot module* (Amersham, pharmacia,biotech) et dans un tampon Tris / Glycine / méthanol (Tris-HCL 25mM, Glycine 200mM, méthanol 20%). La membrane, après un blocage de 16hres avec du lait 5%, est mise en contact pendant 1 heure avec un sérum anti-VP1 (1/10000) produit par notre laboratoire ou bien un sérum anti-VP2/VP3 (1/500) offert par le Dr Richard A. Consigli. Notez que les anti-corps sont dilués dans du TBS-T (Tris 20mM pH 7.6 , NaCl 137mM, Tween - 20 0.5%) additionné de lait écrémé à 5%. Après trois lavages de 10 minutes on procède à la deuxième réaction d'hybridation avec un anticorps anti-lapin couplé à la HRP (*anti-rabbit Ig* NA934, Amersham). Après une hybridation d'une heure, la membrane est lavée trois fois avec le TBS-T pour ensuite être révélée par chemiluminescence (RPN 2108, Amersham).

## **D) Essai d'infection**

### **1. Extraction du virus et titrage.**

Après avoir transfecté les cellules 3T6-Swiss selon la méthode au DOSPER "liposomal transfection reagent" (Boehringer mannheim) ou DEAE-dextran, les cellules sont incubées à 37°C sous une atmosphère contenant 10% CO<sub>2</sub> et dans du DMEM additionné de 2% SVF sur une période allant de 7 à 11 jours. Le virus est extrait des débris cellulaires par un traitement RDE ("receptor destroying enzyme") à 37°C avec 2X10<sup>-5</sup> unité / µl de neuraminidase de *Vibrio cholerae* de Sigma et selon la méthode de Crawford (1962) ; Bourgaux (1964). La concentration de particules virales est évaluée par son activité d'hémagglutination sur des globules rouges de cobaye (Crawford, 1969;

Bourgaux, 1964). Une unité d'hémagglutination (HAU) équivaut à  $10^5$  PFU ("plaque forming unit").

## **2. Passage à l'aveugle**

Sur un tapis cellulaire de 3T6- Swiss d'une confluence variant entre 60-70%, on infecte avec 3 PFU/cellule (soit 30 HAU/  $10^6$  cellules) du virus extrait (RDE) lorsqu'on connaît le titre et avec l'extrait entier lorsqu'aucune activité n'est décelée. Après une heure d'adsorption à 37°C, on ajoute du milieu DMEM additionné de 2% SVF. L'incubation se poursuit à 37°C / CO<sub>2</sub> 10% jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathogène. On procède ensuite à l'extraction du virus par RDE, au titrage et à la réinfection. La réinfection s'effectue ainsi sur environ 4 à 5 passages.

## **E) Construction des ADN plasmidiques**

### **1. Vecteur plasmidique pNN**

#### pNN

Le vecteur pNN découle de plusieurs modifications moléculaires du vecteur pBR322. La délétion du fragment allant du nt 1648 à 2352 du vecteur pBR322 (Bolivar et al., 1977) permet de générer le vecteur pAT153 de 3657 pb (Twigg et Sherratt, 1980). Une délétion des nucléotides allant de 4348 à 573 en passant par le site *EcoRI* (4363 / 1) permet d'éliminer chez pAT153 quelques sites de restriction et d'inactiver le gène de la résistance à la tétracycline. Ces modifications donnent lieu à la molécule nommée pNN (Gendron et al., 1996) (Figure 3).

### Figure 3. Cartes physiques des vecteurs plasmidiques.

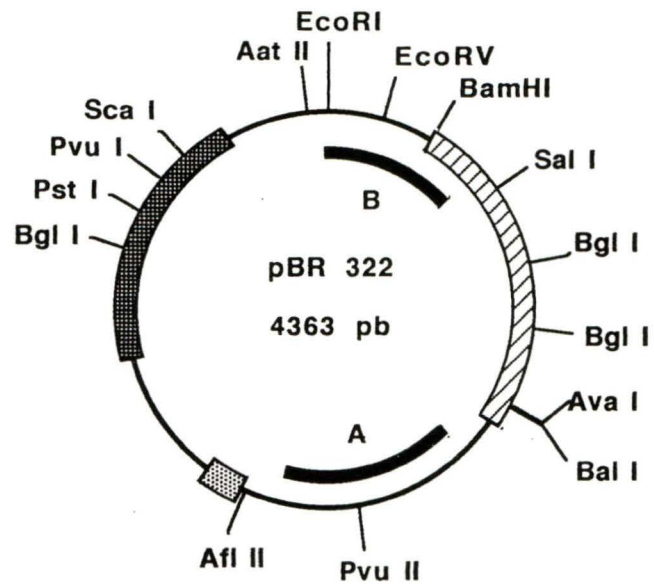
#### A. Carte physique de pBR322 (Bolivar et al., 1977)

pBR322, vecteur de 4363 pb, est la molécule de base pour la génération des vecteurs plasmidiques de type pAT153 et pNN. On retrouve sur cette molécule les gènes qui confèrent la résistance à l'ampicilline et à la tétracycline ainsi qu'une multitude de sites permettant le clonage moléculaire. Comme on peut le constater, c'est par la délétion de la portions A (1648 à 2352) de pBR322 que l'on génère pAT153 (Twigg et Sherrat, 1980). De pAT153, une délétion qui va des nt 4347 à 574 permet de générer pNN (Gendron et al., 1988).

#### B. Carte physique de pNN (Gendron et al., 1988)

Généré par un remaniement de la molécule de base pBR322, pNN est le vecteur plasmidique utilisé dans cette étude. La délétion effectuée sur la molécule pAT153 élimine une partie du gène à la tétracycline et quelques sites de restriction importants tels que *EcoRI*, *EcoRV* et *BamHI*. L'insertion du vecteur pNN dans nos ADN viraux s'effectue au site *Sal I* ce qui leur confère une résistance à l'ampicilline et une excellente capacité de réplication dans les DH5 $\alpha$ .

**A**

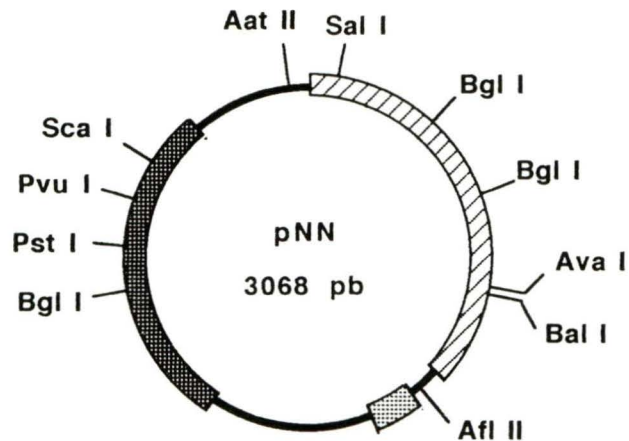


Délétions effectuées





pBR 322 délété de la partie (A) 1648 à 2352: pAT 153 (3657 pb)

pAT153 délété de la partie (B) 4347 à 574: pNN (3068 pb)

**B**



Légende

-  Résistance à la tétracycline
-  Résistance à l'ampicilline
-  Origine de réplication
-  Délétions

### pNNOriPy

Cette molécule contrôle découle de l'introduction de l'origine de réplication de Py dans le vecteur plasmidique pNN. Le fragment contenant l'origine de réplication a été généré par PCR avec les amorces PL-5021 [4997 – 5047] et H-212 [220 – 189]. Ce fragment de 515 pb a été inséré au site *Sal I* de pNN créant ainsi la molécule pNNOriPy de 3.6 Kpb. Notez que l'amorce PL – 5021 permet l'insertion à un site EcoRI dans la molécule pNNOriPy.

## **2. Plasmides recombinants**

### pNNRtsP155

La molécule P155 est un mutant thermosensible de la souche P16 du virus du Py. L'ADN de P155, contrairement à la souche A2, possède une délétion allant des nucléotides 1348 à 1359 dans la région codant pour LT et MT (Gelinas et al., 1982) et une mutation (G → C) au nucléotide 2658 rendant LT thermosensible (Gendron et al., 1988). Cette thermosensibilité de LT limite la croissance virale dans le temps puisque la culture doit être maintenue à 33°C. La molécule RtsP155 est en fait un révertant de cette mutation à 2658 ce qui lui redonne un caractère wt et sa capacité de croître à 37°C. Elle fût isolée d'une culture de cellules Cyp-C13 dont la croissance était maintenue à 39°C (Delbecchi et al., 1981). L'amplification bactérienne de RtsP155 est assurée par le plasmide pNN inséré au site *SalI* (2962) (voir figure 4B).

### pNNRmIwt

Tout comme la molécule P155, RmIts possède également la mutation à 2658 qui confère la thermosensibilité à LT. C'est par le remplacement du fragment allant du site

#### **Figure 4. Cartes physiques des plasmides recombinants.**

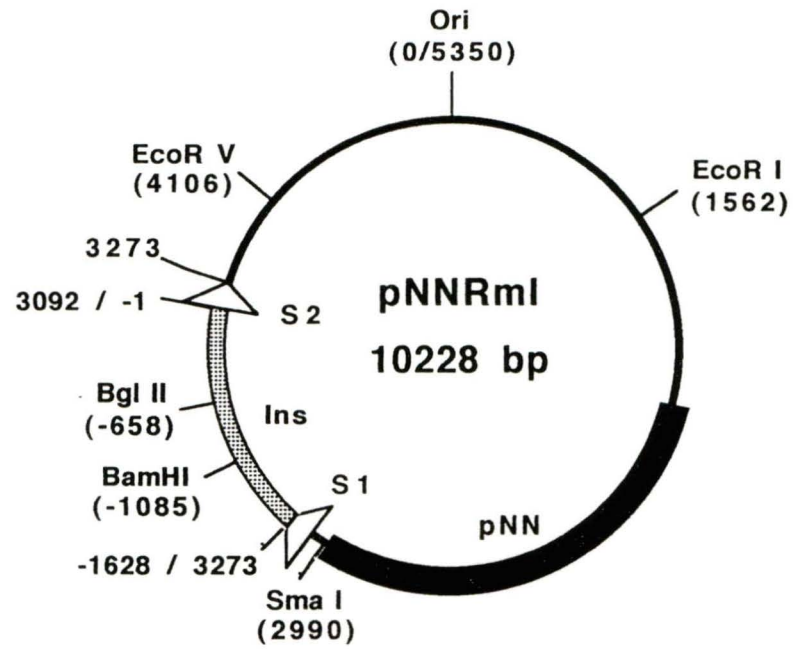
##### **A. Carte physique de pNNRmI**

La molécule pNNRmI provient de l'insertion du vecteur plasmidique pNN au site *Sal I* de RmI. Ainsi jumelé à pNN (Figure 3B), les molécules RmI peuvent être sélectionnées grâce à la résistance à l'ampicilline. C'est donc à partir de cette molécule de base que les mutants de la région tardive de type RmI ont été générés. Comme il est mentionné dans la section Matériel et méthodes la molécule RmI utilisée dans notre étude ne possède plus la mutation à 2658 qui conférait la thermosensibilité de LT. Notez également que le vecteur pNN est excisé des constructions RmI avant toutes transfections.

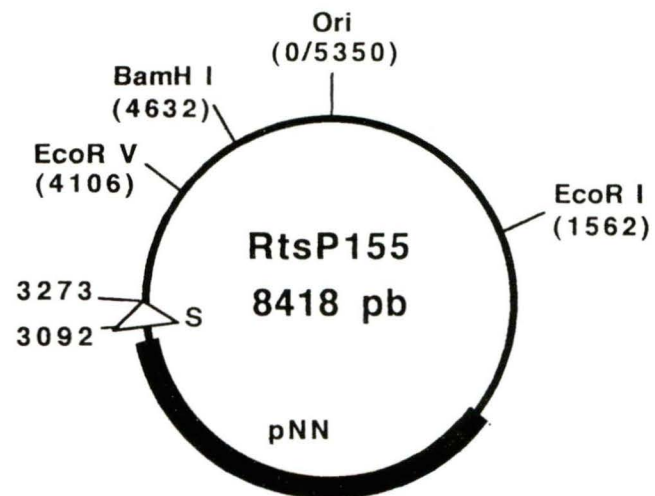
##### **B. Carte physique de pNNRtsP155.**

Tout comme la molécule pNNRmI, pNNRtsP155 est produite par l'insertion du vecteur plasmidique au site *Sal I* de RtsP155. Les mutations de la région tardive, transférées par clonage moléculaire, ont été insérées directement dans la molécule pNNRtsP155. Le vecteur plasmidique pNN permet à pNNRtsP155, ainsi qu'aux constructions qui en dérivent, d'être sélectionné grâce à la résistance à l'ampicilline. Comme la molécule RmI, RtsP155 ne possède plus la mutation à 2658 qui conférait la thermosensibilité de LT. Notez que le vecteur pNN est excisé des constructions RtsP155 avant toutes transfections.

**A**



**B**



*EcoRI* (1562) au site *Sal I* (2962) de la molécule RmIts par celui de la molécule RtsP155 que l'on permet à LT de recouvrer sa thermostabilité. Cette modification donne à RmI la capacité de se répliquer à 37°C (et à 39°C) ce qui permet des temps d'incubation plus courts. L'insertion du vecteur plasmidique de type pNN également au site *Sal I* à 2962 permet d'amplifier pNNRmIwt dans les bactéries compétentes (voir figure 4).

#### pNNP155NCVP1

La molécule pNNP155NCVP1 dérive de pNNRtsP155. Le fragment PCR muté est synthétisé avec la paire d'amorces STOPVP1, contenant la mutation non-sens et le site *SmaI* en 5', et PB 4632 contenant le site *BamHI*. Le fragment de 1666pb est traité par *BamHI* et *SmaI* et substitué à celui dans pNNRtsP155. L'insertion d'une mutation non-sens à la position 3003 de la protéine VP1 de P155, tronquant de 26 a.a., empêche ainsi sa réinfection.

### **3) Mutants RmI des protéines tardives mineures.**

L'introduction d'un codon stop à certaines positions de la séquence tardive du virus du polyome s'est effectuée en plusieurs étapes et selon la technique décrite par Baretino et al. (1994). Une des premières étapes de l'introduction de ces mutations a été la fabrication par PCR des fragments d'ADN mutés. Pour chaque modification ponctuelle, quatre amorces devaient être utilisées pour produire un fragment d'ADN ayant une structure pratique pour le clonage moléculaire. Chaque série d'amorce propre à une mutation nous permettait de produire un fragment de gauche et un fragment de droite en deux PCR distincts (nommés PCR#1 et PCR#2). Notez que toutes les mutations dans RmI ont été générées sur une matrice d'ADN de RmI. Le troisième PCR constitué des



## **Figure 5. Génération par PCR des mutations de la région tardive.**

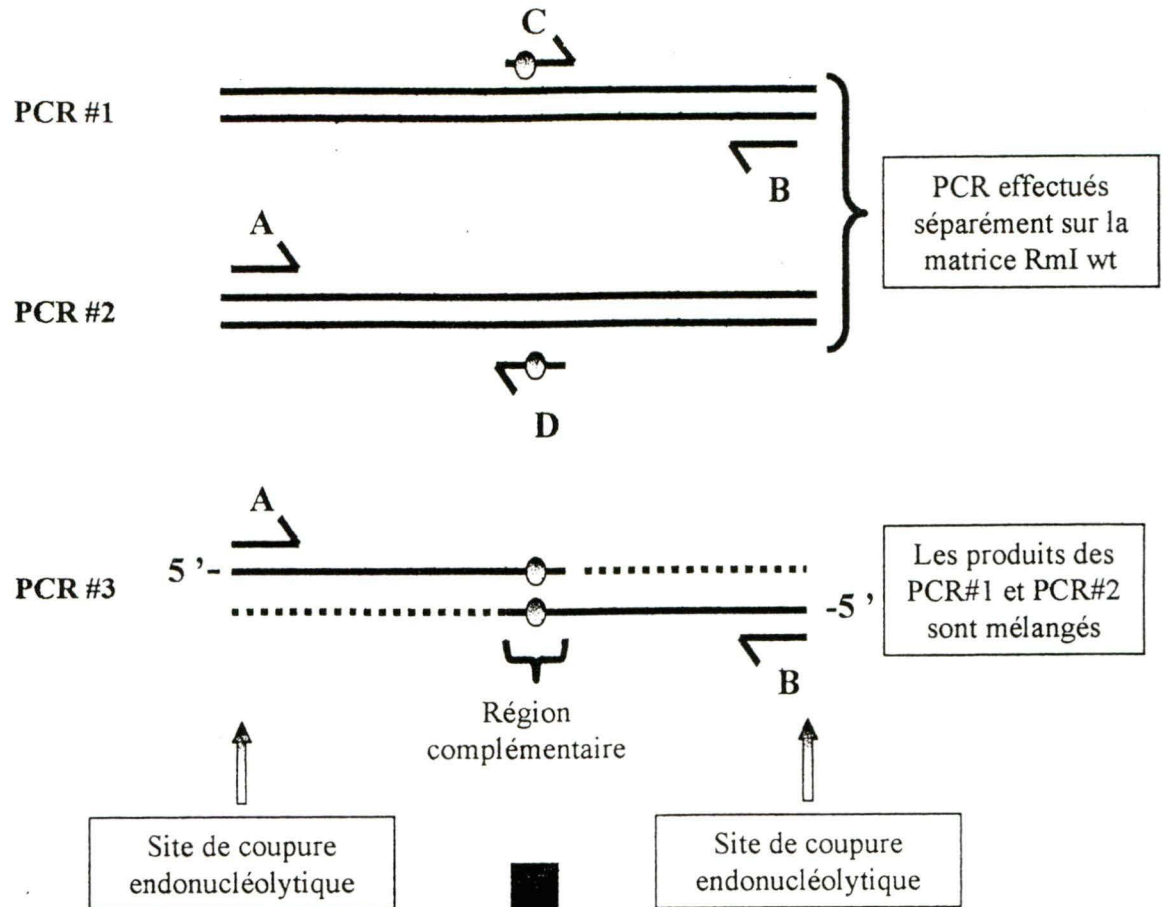
### **A. Technique de mutagenèse par PCR.**

Mise au point par Barrettino et al (1994) cette technique de mutagenèse permet de générer une mutation ponctuelle par PCR. Pour l'élaboration d'un fragment muté quatre amorces sont nécessaires, deux amorces spécifiques à la mutation et 2 autres non-spécifiques. Les amorces non-spécifiques (soient A et B sur le schéma) sont choisies en conséquence des sites de clonage disponibles dans la molécule réceptrice. Les amorces spécifiques (soient C et D) sont des séquences complémentaires et anti-parallèles afin de permettre la génération d'une portion d'homologie entre les fragments des deux premiers PCR. Les amorces spécifiques portent la mutation qui doit être introduite (représentée par un ovale ombragé). On génère tout d'abord, en deux PCR distinct, les fragments de gauche et de droite par les amorces A,D et C,B respectivement. Les produits des PCR#1 et PCR#2 sont ensuite utilisés comme matrice pour le PCR#3. Pour la génération du fragment de pleine longueur au PCR#3, seulement les amorces non-spécifiques A et B sont utilisées. L'appariement par la région d'homologie des fragments de gauche et de droite constitue l'événement initiateur de la synthèse du fragment de pleine longueur. L'élongation des extrémités 3' (représenté par le pointillé) permet ensuite aux amorces A et B de s'associer au fragment et d'amorcer l'amplification. Le fragment muté ainsi produit est traité par des enzymes de restriction et substitué au fragment non-muté de la molécule réceptrice, en l'occurrence RmI.

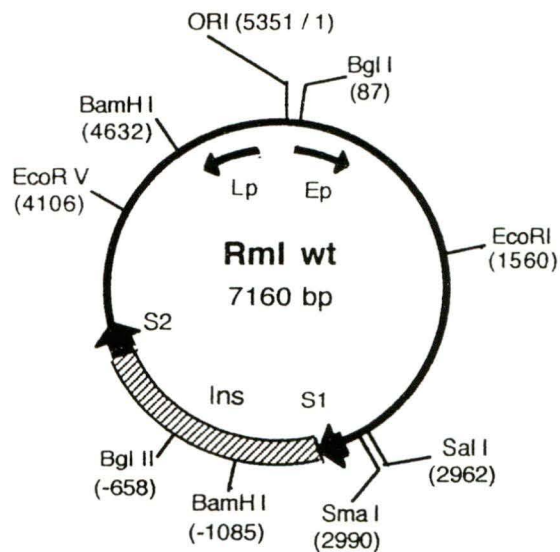
### **B. Introduction des fragments mutés dans RmI.**

C'est par les sites de restriction indiqués dans l'encadré que les fragments portant la mutation VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 ont été introduits dans la molécule RmIwt.

**A**



**B**



Nom de la mutation	Sites de clonage	Position de la mutation
VP2 / S	Eco RV / Eco RI	4684 (G → T)
VP2 / VP3 S1	Eco RV / Eco RI	4613 (C → A)
VP2 / VP3 S2	Bgl II / Eco RV	4078 (G → T)

fragments des PCR#1 et #2 et des amorces externes permet de générer le fragment pleine longueur qui sera utilisé pour le clonage (voir figure 5a). Des sites enzymatiques situés aux extrémités du fragment pleine longueur permet son clonage dans les molécules de type RmI (voir figure 5b).

#### pNNRmI VP2/S

Cette molécule possède un codon non-sens au nt 4684. La substitution d'un G vers un T empêche la protéine VP2 d'être exprimée à sa pleine longueur. N'affectant pas la production de VP3 ni de VP1, cette mutation ponctuelle n'aura son effet qu'à la traduction de l'ARNm de VP2. En ce référant à la figure 5a, le PCR#1 utilise les amorces Syl S [4674 – 4700] (C) et Sy 1 [1746 – 1723] (B) et génère ainsi le fragment de droite. Le PCR#2, générant le fragment de gauche, est constitué des amorces EcoRV [4102 – 4123] (A) et VP2/S [4694 – 4674] (D). Après isolation, purification et quantification, les fragments de gauche et de droite possédant une homologie centrale ont été utilisés, à raison de 5ng chacun, pour le PCR#3. Le PCR#3 s'est alors déroulé avec les amorces Sy 1 [1746 – 1723] (B) et EcoRV [4102 – 4123] (A) générant ainsi le fragment pleine longueur. Le fragment muté ainsi obtenu est digéré par *EcoRV* / *EcoRI* et substitué au fragment original dans pNNRmIwt.

#### pNNRmI VP2/VP3 S1

Cette molécule possède un codon non-sens au nt 4613 (C → A) ce qui tronque les protéines VP2 et VP3. Ne touchant pas au gène de la protéine majeure VP1, ce mutant permet d'étudier la recombinaison en absence des protéines mineures fonctionnelles. En ce référant à la figure 5a, le fragment de droite est généré au PCR#1 par les amorces Syl

S1 [4603 – 4629] (C) et Sy 1 [1746 – 1723] (B). Le fragment de gauche généré par le PCR#2 a été produit par les amorces EcoRV [4102 – 4123] (A) et VP2/VP3 S1 [4622 – 4605] (D). Après isolation, purification et quantification, les fragments de gauche et de droite possédant une homologie centrale ont été utilisés, à raison de 5ng chacun, pour le PCR#3. Le PCR#3 s'est alors déroulé avec les amorces Sy 1 [1746 – 1723] (B) et EcoRV [4102 – 4123] (A). Le fragment muté ainsi obtenu est digéré par *EcoRV* / *EcoRI* et substitué au fragment original dans pNNRmIwt.

#### pNNRmI VP2/VP3 S2

Possédant un codon non-sens au nt 4978 (G → T) cette molécule empêche la portion C-terminale des protéines VP2 et VP3 d'être exprimée. Perdant le signal de localisation nucléaire, elles conservent cependant le domaine de liaison à VP1. Toujours en ce référant à la figure 5a, la génération du fragment de droite au PCR#1 s'est effectuée par les amorces Syl S2 [4067 – 4093] (C) et Sy 1 [1746 – 1723] (B). Le fragment de gauche généré par le PCR#2 a été produit par les amorces Ins [-669 / -650] (A) et VP2/VP3 S2 [4085 – 4067] (D). Après isolation, purification et quantification, les fragments de gauche et de droite possédant une homologie centrale ont été utilisés, à raison de 5ng chacun, pour le PCR#3. Le PCR#3 s'est alors déroulé avec les amorces Ins [-669 / -650] (A) et l'amorce VP2/VP3 S1 [4622 – 4605] . La génération d'un fragment plus court (environ 2 kpb) avec l'amorce VP2/VP2 S1 [4622 – 4605] favorisait la synthèse du fragment pleine longueur avec l'ADN polymérase *Pwo* . D'autant plus que les sites de clonage utilisés éliminaient la mutation que pouvait introduire l'amorce externe VP2/VP3 S1 sur le fragment pleine longueur portant la mutation VP2/VP3 S2. Le fragment pleine longueur une fois isolé, purifié et quantifié est digéré par les enzymes

de restriction *Bgl II* / *EcoRV* pour être ensuite substitué au fragment original dans la molécule pNNRmIwt.

#### **4) Mutants P155 des protéines tardives mineures**

La fabrication des mutants tardifs de P155 est de loin plus facile que la génération des mutants tardifs de RmI. Les réactions de mutation par PCR étant effectuées pour les molécules RmI, un simple transfert de fragment vers les molécules P155 nous permet de générer les mutants tardifs de type P155 (figure 6).

##### pNNRtsP155 VP2/S

Le fragment *EcoRV* (4106) / *EcoRI* (1560) de la molécule pNNRmI VP2/S est isolé sur gel d'agarose fondant 1%, purifié et quantifié. La molécule réceptrice, soit pNNRtsP155 est également traitée avec les mêmes endonucléases, soit *EcoRI* / *EcoRV*. On isole ensuite le fragment adéquat pour le clonage, on le purifie et on le quantifie. Le clonage moléculaire s'effectue alors par la ligation du fragment muté VP2/S provenant de RmI avec la molécule réceptrice pNNRtsP155. On génère ainsi la molécule pNNRtsP155 VP2/S.

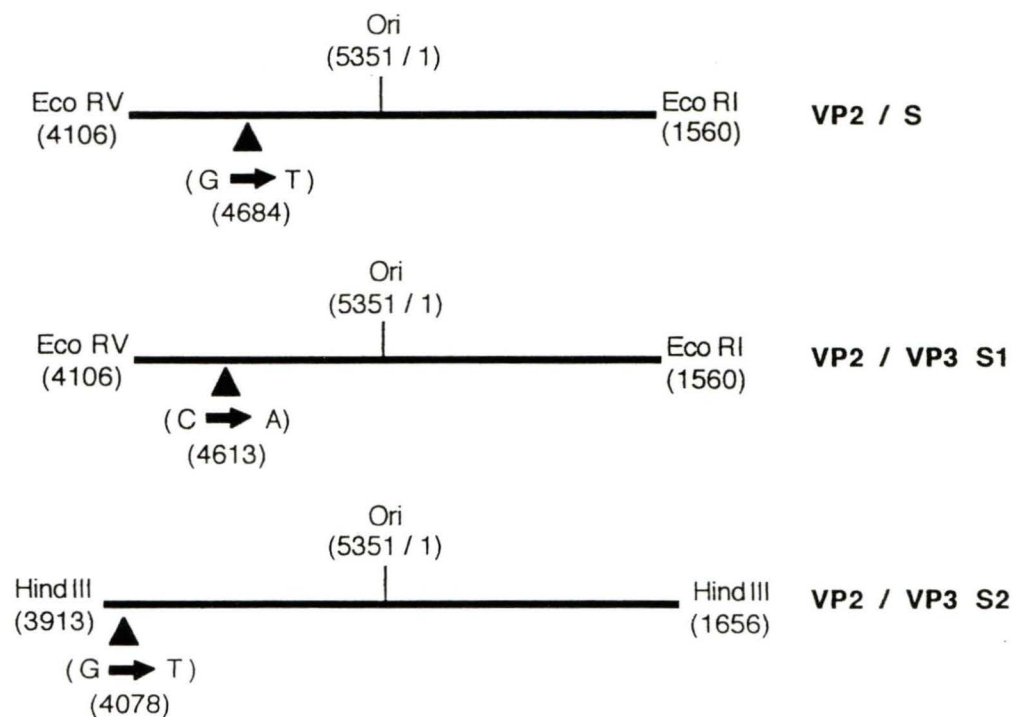
##### pNNRtsP155 VP2/VP3 S1

Le fragment *EcoRV* (4106) / *EcoRI* (1560) de la molécule pNNRmI VP2/VP3 S1 est isolé, purifié et quantifié. La molécule réceptrice soit pNNRtsP155 est également traitée par ces endonucléases, soit *EcoRV* / *EcoRI*. On isole ensuite le fragment adéquat pour le clonage, on le purifie et on le quantifie. La ligation entre le fragment possédant la

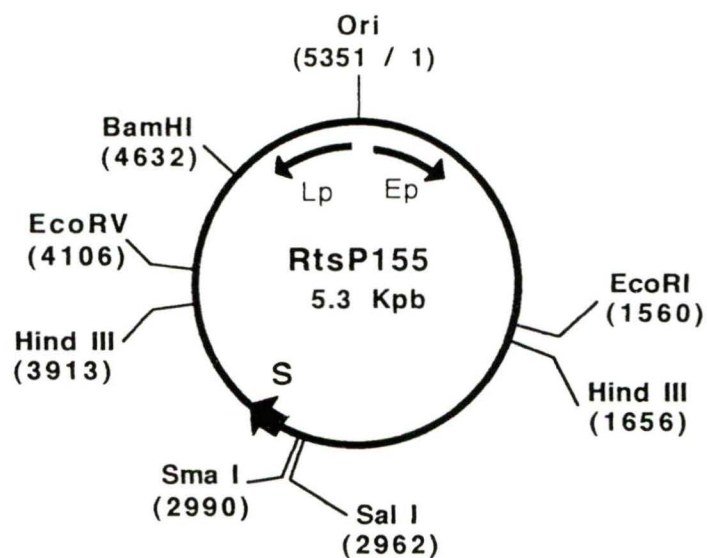
## **Figure 6. Introduction des mutations de la région tardive dans la molécule RtsP155.**

Initialement introduites dans la molécule RmI, les mutations de la région tardive ont été transférées dans la molécule RtsP155. C'est par digestion enzymatique que les fragments qui portent la mutation ont été extraits des mutants RmI. Et c'est en substituant ces fragments aux fragments correspondants chez RtsP155 que les molécules RtsP155VP2/S, RtsP155VP2/VP3 S1 et RtsP155VP2/VP3 S2 ont été générées. La position des mutations ainsi que le type de modification est indiqué sur le schéma.

Fragments extraits des  
mutants Rml respectifs.



Insertion des fragments mutés  
dans la molécule RtsP155.



mutation VP2/VP3 S1 et la molécule réceptrice pNNRtsP155 génère ainsi la molécule pNNRtsP155 VP2/VP3 S1.

#### pNNRtsP155 VP2/VP3 S2

Le fragment Hind III (3919) / Hind III (1656) de la molécule pNNRmI VP2/VP3 S2 est isolé, purifié et quantifié. La molécule réceptrice, soit pNNRtsP155 est également traitée par cette endonucléase (Hind III). On isole ensuite le fragment adéquat pour le clonage, on le purifie et on le quantifie. La ligation entre le fragment possédant la mutation VP2/VP3 S2 et la molécule réceptrice pNNRtsP155 génère ainsi la molécule pNNRtsP155 VP2/VP3 S2.

### **5) Élaboration des vecteurs d'expression**

#### **Vecteur pCMVOriPy**

Pour les essais de complémentation, la molécule pEGFP-N1 (Clontech; GenBank Accession #U55762) a été utilisée comme squelette de base pour la fabrication des vecteurs exprimants VP2 et VP3. pEGFP-N1 est un vecteur relativement simple. Le gène EGFP est sous l'influence d'un promoteur CMV et il possède la résistance à la kanamycine. L'origine pUC permet son amplification dans les systèmes procaryotes et un site de clonage multiple est placé entre pCMV et le gène EGFP. Ce dernier a été extrait du vecteur par traitement avec les enzymes *EcoRI* et *Not I* qui délimitent la portion N-terminale et C-terminale respectivement. Ne possédant plus le gène EGFP, nos gènes tardifs pourront être exprimés seuls et non sous forme de protéine fusion. Pour soutenir la réplication de ces vecteurs dans les fibroblastes de souris, l'origine de réplication de Py a été inséré au site *AflIII* (1640) de pEGFP-N1. Le fragment de Py qui a



été inséré au site *AflIII* va des nucléotides 5022 à 212 en passant par l'origine. Ce fragment a été produit par PCR à l'aide des amorces Afl II 5021 [5022 – 5043] et Afl II 212 [220 – 189]. Ce fragment isolé, purifié et quantifié a ensuite été inséré par ligation au site *Afl II* de la molécule pEGFP-N1 (voir figure 7).

#### pCMV OriPyVP2

Ce vecteur d'expression a été généré en substituant le gène EGFP de la molécule pEGFP-N1 par le gène VP2 de Py. Le gène VP2 inséré dans ce vecteur est sous le contrôle du promoteur CMV. Le fragment encodant le gène VP2 a été produit par PCR avec les amorces SC start VP2 5' [5002-4985] et SC stop VP3/VP2 3' [4046-4081]. Après son isolation, sa purification et sa quantification, le fragment est digéré par *EcoRI* (632) / *Not I* (1402) et inséré par ligation dans la molécule pCMV OriPy. On génère ainsi le vecteur d'expression pCMV OriVP2 (voir figure 7).

#### pCMV OriPyVP3

Ce vecteur d'expression a également été produit en substituant le gène EGFP de la molécule pEGFP-N1 par le gène VP3 de Py. Le gène VP3 inséré dans ce vecteur est sous le contrôle du promoteur CMV. Le fragment encodant le gène VP3 a été produit par PCR avec les amorces SC start VP3 5' [4657- 4637] et SC stop VP3/VP2 3' [4046 – 4081]. Après son isolation, sa purification et sa quantification, le fragment est digéré par *EcoRI* (632) / *Not I* (1402) et inséré par ligation dans la molécule pCMV OriPy. On génère ainsi le vecteur d'expression pCMV OriPy VP3 (voir figure 7).

## **Figure 7. Carte physique des vecteurs d'expression de type pCMVOriPy.**

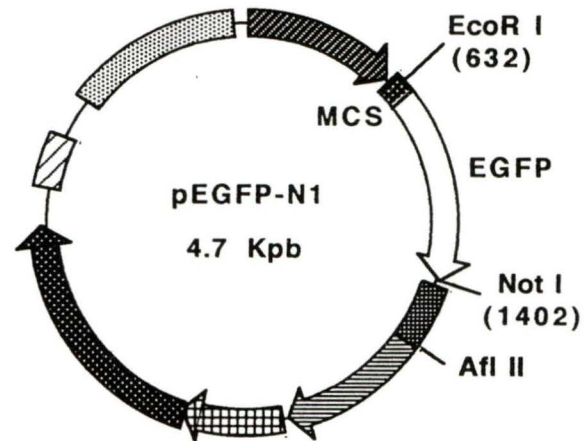
### **A. Carte physique de la molécule pEGFP-N1.**

Cette molécule commercialement disponible (Clontech; Genbank Accession #U55762) est généralement utilisée pour l'expression de protéines fusionnées avec la protéine de fluorescence verte (EGFP). Un gène introduit au site de clonage multiple (mcs) sera sous le contrôle du promoteur pCMV E1. Son origine pUC ainsi que son gène de résistance à la kanamycine permettent une excellente amplification et sélection bactérienne. Pour adapter cette molécule à nos besoins expérimentaux, on a dû premièrement déléter le gène EGFP afin de ne pas produire de protéine de fusion. Et deuxièmement, introduire au site *Afl II* une Ori Py afin de permettre sa répllication dans nos cellules de souris. Ces deux modifications ont permis de générer un vecteur d'expression protéique (pCMVOriPy) adapté à notre système.

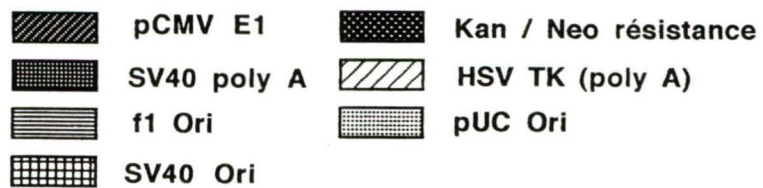
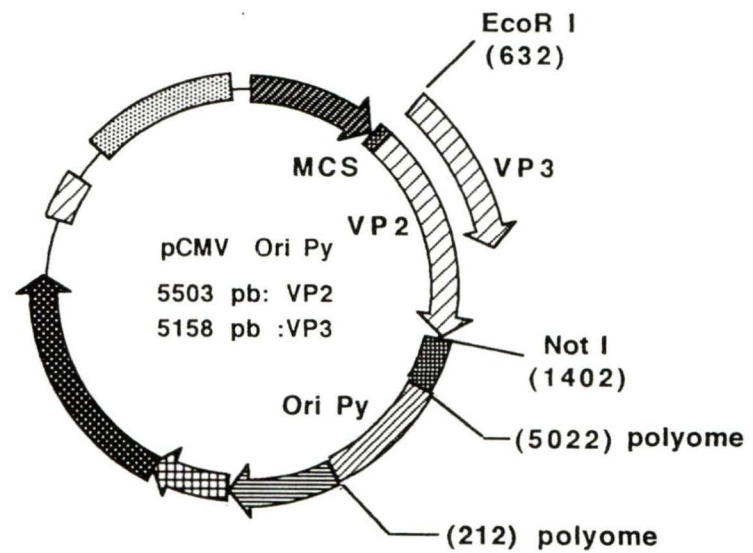
### **B. Carte physique des vecteurs d'expression de type pCMVOriPy**

Découlant de la molécule pEGFP-N1, le vecteur d'expression pCMVOriPy possède tout de même les caractéristiques de base du vecteur initial. Synthétisés par PCR, les gènes VP2 et VP3 ont été introduits au site EcoRI et Not I de la molécule pCMVOriPy (voir Matériel et méthodes). On génère ainsi les vecteurs d'expression pCMVOriPyVP2 (5.5 Kpb) et pCMVOriPyVP3 (5.1 Kpb).

**A**



**B**



## **Vecteurs pLRP**

### PLRP

Constitué de la région tardive de la souche A3 de polyome, cette série de vecteurs d'expression se conforme à la régulation temporelle et quantitative des besoins en protéines tardives du virus du polyome. C'est par une réaction PCR utilisant les amorces : PB 112-88 (A3) et PB 2862-2884 (A3) que la région tardive de la souche A3 a été isolée. Flanquée par deux sites *Sal I* (positions 112 et 2862) introduits par les amorces, le fragment ainsi produit a été digéré et ligué avec le vecteur pNN également traité par *Sal I* (651). On obtient ainsi le vecteur de base pLRP qui exprime les trois protéines tardives.

### pVP2/VP3

Le vecteur pVP2/VP3 découle de la molécule pLRP. C'est en introduisant un changement de cadre de lecture du gène VP1 que l'on permet à ce vecteur de ne produire que les protéines mineures. Cette modification du gène VP1 ne touche cependant pas aux séquences régulatrices de la région tardive. Pour introduire le changement de cadre de lecture, une digestion par *Hind III* (3918) a d'abord été effectuée sur la molécule pLRP. Les extrémités protubérantes générées par cette digestion sont ensuite remplies par un traitement à la *Klenow* (Pharmacia Biotech) et selon les recommandations du fabricant. On recircularise ensuite cette molécule par ligation intramoléculaire. La molécule refermée possède alors un changement de cadre de lecture pour le gène VP1 qui se traduit par l'apparition d'un codon non-sens quelques nucléotides plus loin. On génère ainsi la molécule pVP2/VP3 qui ne produit que les protéines VP2 et VP3 (voir figure 8).

## Figure 8. Cartes physiques des vecteurs d'expression de type pLRP.

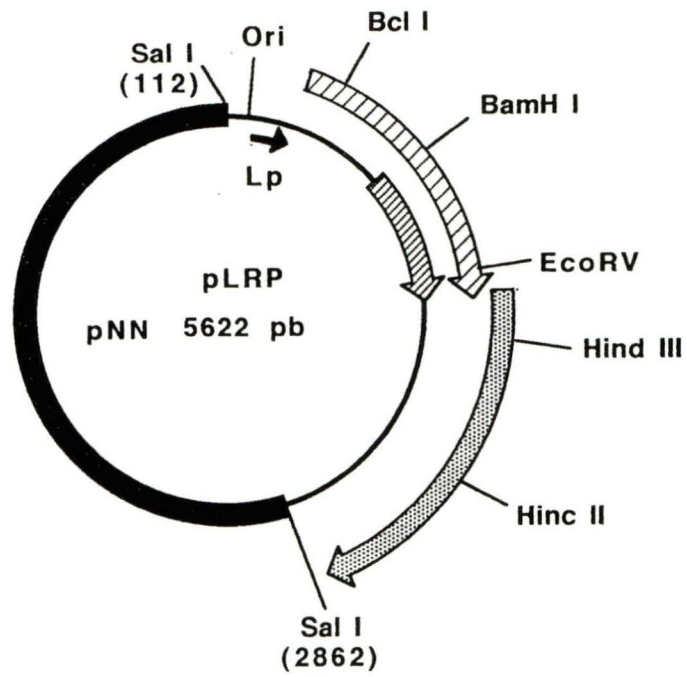
### A. pLRP

La molécule de base pLRP correspond à la portion tardive de la souche A3 de polyome associée au vecteur plasmidique pNN. Isolée par PCR, la portion tardive utilisée pour générer pLRP possède l'origine de réplication ainsi que le promoteur tardif. La souche A3 a été utilisée puisque que le site *Sal I* se retrouve au nt 2862 au-lieu de 2962 comme chez P155. Notez que le site *Sal I* chez P155 se situe dans la portion 3' du gène de VP1. En utilisant la souche A3 on pouvait utiliser le site de clonage *Sal I* et conserver la portion C-terminale de VP1. Notez que le vecteur pNN est excisé de la molécule pLRP avant la transfection. Capable d'exprimer les trois types de protéines tardives, la molécule pLRP a été utilisée comme molécule de départ pour la génération des autres vecteurs de type pLRP.

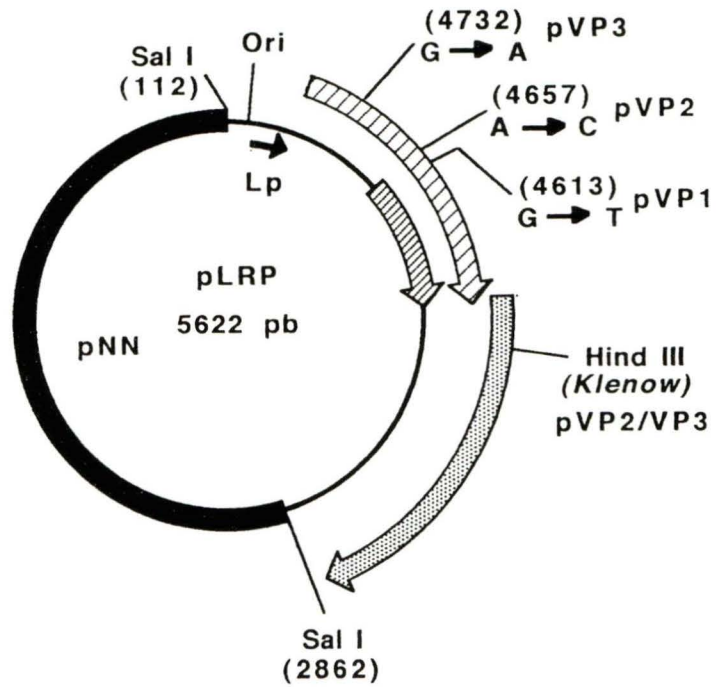
### B. Vecteurs d'expression découlant de pLRP.

C'est à partir de la molécule pLRP qu'ont été générés les vecteurs d'expression de protéines tardives spécifiques. En introduisant différentes modifications en des endroits bien spécifiques on permet l'expression sélective des différentes protéines. La molécule exprimant VP2 et VP3 seulement (pVP2/VP3) a été générée par un changement de cadre de lecture. Le remplissage par la Klenow des extrémités générées par une coupure *Hind III* permet la terminaison prématurée de la traduction de l'ARNm de VP1, mais sans affecter la production de VP2 et VP3. Les vecteurs pVP2 et pVP3 ont été produits par l'introduction de mutations ponctuelles dans la molécule pVP2/VP3. Une modification du codon d'initiation de VP3 au nt 4657, mais qui n'affecte pas le cadre de lecture de VP2, génère à partir de pVP2/VP3 la molécule pVP2. L'introduction d'un codon non-sens au nt 4732 de la molécule pVP2/VP3, provoque la terminaison précoce de VP2 sans affecter la production de VP3, ce qui génère la molécule pVP3. Quant au vecteur qui exprime seulement VP1 (pVP1), on arrive à le produire en introduisant un codon non-sens au nt 4613 de la molécule pLRP. La mutation au nt 4613 correspond à la modification VP2/VP3 S1. Pour toutes les molécules dérivées de pLRP, l'excision du vecteur plasmidique pNN est également effectuée avant la transfection.

**A**



**B**



**Légende**



### pVP2

Le vecteur pVP2 découle de la molécule pVP2/VP3. En substituant un nucléotide du codon d'initiation de VP3 on permet à ce vecteur de ne produire que VP2. La destruction du codon d'initiation s'est effectué par mutagenèse par PCR (Barettino et al., 1994) et permet la substitution d'un A pour un C du codon ATG à 4657. En se référant à la figure 5a, le fragment de droite du PCR#1 a été généré par les amorces PR4 [4643 – 4669] (C) et HaeL [79 – 104] (B) sur une matrice d'ADN de P155. Le fragment de gauche du PCR#2 a été généré par les amorces EcoRV [4102 – 4123] (A) et PR3 [4662 – 4637] (D) sur une matrice de P155. Après isolation, purification et quantification, les fragments de gauche et de droite possédant une homologie centrale, ont été mélangés ensemble à raison de 5ng chacun pour la réaction du PCR#3. La réaction du PCR#3 a alors généré le fragment de pleine longueur avec les amorces EcoRV [4102 – 4123] (A) et HaeL [104-79] (B). Le fragment pleine longueur ainsi généré est digéré par *Apa I* (2) / *BamHI* (4632) pour être ensuite substitué au fragment correspondant dans la molécule pVP2/VP3. On obtient ainsi le vecteur d'expression pVP2 (voir figure 8).

### pVP3

Le vecteur pVP3 découle également de la molécule pVP2/VP3. L'introduction d'un codon non-sens à 4732 provoque la terminaison de la traduction de VP2 de façon précoce. Cette modification s'est effectuée via la mutagenèse par PCR (Barettino et al., 1994 ). En se référant au schéma de la figure 5a, le fragment de droite du PCR#1 a été généré par les amorces VP2 sbnc [4722 – 4745] et HaeL [104 – 79] sur une matrice d'ADN de P155. Le fragment de gauche du PCR#2 a été généré par les amorces EcoRV [4102 – 4123] (A) et VP2 sbc [4737 – 4719] (D). Après leur isolation, purification et

quantification, les fragments de gauche et de droite qui possèdent une homologie centrale ont été mélangés ensemble à raison de 5ng chacun pour la réaction du PCR#3. Le PCR#3 a alors généré le fragment de pleine longueur avec les amorces *EcoRV* [4102 – 4123] (A) et *HaeL* [104 – 79] (B). Le fragment pleine longueur ainsi généré est digéré par *Apa I* (2) / *BamHI* (4632) et substitué au fragment correspondant dans la molécule pVP2/VP3. On obtient ainsi le vecteur d'expression pVP3 (figure 8).

### pVP1

Le vecteur pVP1 découle de la molécule de base, soit pLRP. L'introduction d'un codon non-sens à 4613 permet d'abolir la production des protéines mineures, mais conserve la production de la protéine VP1. Une substitution du fragment *EcoRV* (4106) / *BamHI* (4632) provenant de la molécule pNNRtsP155VP2/VP3 S1 au même fragment chez pLRP, a permis de générer la molécule pVP1 (voir figure 8).

## **F) Synthèse des fragments PCR**

### **Molécule contrôle pNNOriPy**

	<b>Sal I</b>	<b>EcoRI</b>
PL – 5021 [4997 – 5047]	5'-CCGTCGACCCGGGAATTCGATATCTAGATGA	TCAGCTTCAGAAGATGGCGG-3'
	<b>Sal I</b>	
H-212 [220 – 189]	5'-GGGTCGACGCAGCCTTTCTTTGTCAGCTCTGC-3'	



### **Amorces utilisées pour la molécule contrôle pNNP155NCVP1**

Sma I

STOPVP1 [2983 – 3006]      5'-GTCCCCGGGTACAGGTTAAGTCCC-3'

BamHI

PB 4632 [4649 – 4630]      5'-GATACCATGGCGGGAATCCAG-3'

### **Insertion des mutations dans les gènes VP2 et VP3 (Constructions RmI)**

#### **Amorces utilisées aux extrémités des fragments**

Bgl II

Ins [-669 / -650]      5'- TTCCTAGAGATCTGTACTGG-3'

EcoRV [4102 – 4123]      5'- GTGTGATATCACCGTACAGCCC-3'

Sy 1 [1746 – 1723]      5'-TTATTAAGTAAATGGTGCTGCGG-3'

#### **Amorces utilisées pour générer les mutations S, S1 et S2**

VP2/S [4694 – 4674]      5'-CCTACACAACTAAGAGGTCCC-3'

VP2/VP3 S1 [4622 – 4605]      5'-CGATATATAATTCCCAGG-3'

VP2/VP3 S2 [4085- 4067]      5'- CATAGAGTAAGATGGCCCC- 3'

Syl S [4674-4700]      5'-GGGACCTCTTAGTTGTGTAGGTACCGC-3'

Syl S1 [4603 – 4629]      5'-CTCCTGGGAAATTATATATCGAGAAGGG- 3'

Syl S2 [4067 – 4093]      5'-GGGGCCATCTTACTCTATAGCTGTTGC- 3'

### **Insertion de l'origine dans pCMV OriPy**

Afl II 5021 [5022 – 5043]      5'-CCCCTTAAGATCAGCTTCAGAAGATGGCGG-3'

Afl II 212 [220 – 189]      5'-CCCCTTAAGCAGCCTTTCTTTGTCAGCTCTGC-3'

## **Clonage de VP2 et VP3 dans pCMV Ori Py**

### **EcoRI**

SC start VP2 5' [5002- 4985]      5'-CGGCGAATTCTGAAAATGGGAGCCGCACTGACT-3'

### **EcoRI**

SC start VP3 5' (4657- 4637)      5'-CGGCGAATTCTGAATATGGCGTTGATACCATGGCGG-3'

### **Not I**

SC stop VP3/VP2 3' [4046-4081]      5'-GTCGCGGCCGCTATCATTTTCGCATTTAGAGACGCCG-3'

## **Élaboration des vecteurs de type pLRP**

### **Amorces utilisées pour générer la molécule pLRP**

#### **Sal I**

PB 112-88 (A3)      5'-GGGGCTGACGGGTGGCCCCACAGCGCCTCCAAGG-3'

#### **Sal I**

PB 2862 – 2884 (A3)      5'-GGGGTCGACGGCGACGACCCCTTGAAGGACAT-3'

### **Molécules pVP2 et pVP3**

### **Amorces utilisées aux extrémités des fragments**

EcoRV [4102 – 4123]      5'- GTGTGATATCACCGTACAGCCC-3'

Hae L [104 – 81]      5'- CCACAGCGCCTCCAAGGCGCCAGTCC-3'

### **Amorces mutées utilisées pour générer la molécule pVP2**

PR3 [4662 – 4637]      5'- GAAATCTGGCGTTCATACCATGGCG-3'

PR4 [4643 – 4669]      5'- TGGTATCAACGCCAGATTCTATTAC-3'

### **Amorces mutées utilisées pour générer la molécule pVP3**

VP2 sbc [4737 – 4719]      5'-CAGTTTAAGGTGCCTCTAC-3'

VP2 sbnc [4722 – 4745]      5'-GAGGCACCTTAAACTGTCTGCATC-3'

## **Résultats**

Afin de cibler l'implication des protéines tardives mineures au niveau de la recombinaison de RmI, des mutations ponctuelles ont été introduites dans la séquence codante de VP2 et VP3. Les fragments mutés générés par PCR (Matériel et méthodes) ont été introduits initialement chez RmI par clonage moléculaire. Trois types de mutants ont été ainsi produits soit: VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 dont les mutations se retrouvent respectivement à 4684, 4613 et 4078 (voir figure 9A). Ces mutations visaient essentiellement à introduire un codon non-sens de façon à provoquer l'expression de protéines mineures tronquées. La mutation VP2/S devait permettre d'inactiver sélectivement la protéine VP2, tandis que les mutations VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 devaient chacune interrompre la traduction de VP2 et VP3. La mutation VP2/VP3 S1 visait plus précisément à enlever une portion C-terminale privant VP2 et VP3 du domaine de liaison à VP1 et de leur signal de localisation nucléaire. Comparativement à la mutation VP2/VP3 S1, la mutation VP2/VP3 S2 ne visait qu'à empêcher la traduction du signal de localisation nucléaire des deux protéines mineures. Comme on peut le constater, ces trois mutations ne permettent pas d'analyser l'effet de l'inactivation de la protéine VP3 seule. Bien qu'il aurait été intéressant d'utiliser un mutant VP3 à titre de comparaison, son absence aurait probablement eu peu d'effet sur la recombinaison. En effet, la protéine VP2 possédant entièrement la séquence primaire de VP3 est capable de remplir la majeure partie des fonctions de cette dernière. Comme on pourra le constater plus loin, une inactivation de VP2 qui laisse VP3 intacte et une inactivation des deux protéines mineures ont le même effet sur la recombinaison, soulevant ainsi une faible implication de VP3 dans la conversion de RmI en P155.

Notez que ces mutations ne touchent aucunement la séquence codante de la protéine majeure, qui est essentielle pour le transport au noyau des protéines tardives. Bien que VP2 et VP3 possèdent leur propre signal de localisation nucléaire, leur coopération avec VP1 est essentielle pour assurer un transport efficace au noyau (Barouch et Harrison, 1994; Delos et al., 1993; Forstova et al., 1993). La co-expression de VP1 avec VP2 et VP3 est importante pour assurer une stoechiométrie adéquate des protéines tardives au noyau. RmI ne peut cependant produire une protéine VP1 de pleine longueur en raison de l'insertion d'ADN génomique de souris (figure 2). RmI produit plutôt une forme tronquée de VP1, soit VPX, qui correspond au 328 a.a. N-terminaux de VP1 plus 9 a.a. codés par l'origine murine. Comme cela a été mentionné dans l'introduction, des travaux antérieurs ont démontré que la recombinaison de RmI semble être dépendante de VPX. On croit que VPX est capable de s'assembler en pentamères et d'interagir avec VP2 et VP3 tout comme VP1 (Chen et al., 1998; Delos et al., 1993). On peut donc concevoir que les complexes VPX/VP2 et VPX/VP3, peuvent être transportés au noyau où ils se lieront à l'ADN de RmI pour agir sur la recombinaison. Comme on pourra le constater, les expériences effectuées découlent de l'étude de ces trois mutants, qui ont permis de faire la lumière sur l'implication des protéines tardives mineures au niveau de la recombinaison intramoléculaire.

#### **A) Mutations des protéines tardives mineures chez RmI.**

Il faut tout d'abord mentionner que la molécule RmI utilisée ne possède plus la transversion à 2658 (Gendron et al., 1988) créant un LT thermosensible. Une permutation du fragment *EcoRI* / *Sal I* de RmI ts avec le fragment correspondant de

RtsP155 a permis de conférer à RmI la capacité de coder un LT thermostable autorisant sa réplication à 37°C. Le développement viral étant plus rapide à 37°C qu'à 33°C, l'utilisation de la molécule RmIwt a amené une économie de temps considérable. Les mutations ponctuelles destinées à inactiver les protéines tardives mineures ont alors été introduites chez RmIwt.

Les mutants RmIwt VP2/S, RmIwt VP2/VP3 S1 et RmIwt VP2/VP3 S2 ont d'abord été transfectés dans des lignées cellulaires ScopT<sub>1</sub> et 3T6. Après trois jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10% de CO<sub>2</sub>, l'ADN de faible poids moléculaire a été extrait selon la méthode de Hirt (1967). Le quart du volume dans lequel l'ADN de faible poids moléculaire a été resuspendu, correspondant également à un quart des cellules récoltées, est généralement utilisé pour la digestion enzymatique. Une linéarisation par *EcoRI* et un traitement par *DpnI*, clivant l'ADN non répliqué, ainsi qu'une digestion par la ribonucléase A, sont effectués avant le dépôt sur gel d'agarose 1%. Après migration, l'ADN est transféré sur membrane de nylon et hybridé avec une sonde virale radiomarquée. Les figures 9B et 9C montrent les résultats des autoradiogrammes ainsi obtenus par la transfection des molécules RmI mutées dans les cellules de type ScopT<sub>1</sub> et 3T6, tandis que les figures 10B et 10C montrent les analyses densitométriques obtenus par la numérisation de ces autoradiogrammes (Matériel et méthodes). Ces résultats indiquent dès l'abord que ces modifications affectent non seulement le niveau d'accumulation du précurseur (RmI), mais également le taux de conversion de RmI en P155.

Comme les résultats de la figure 9B et 9C le démontrent, l'accumulation des molécules RmI mutées (7.1Kpb) semble être plus importante que dans le cas du type sauvage. Cette accumulation d'intensité variable, comme en témoigne les résultats densitométriques (voir Figure 10B), est la plus importante pour la mutation VP2/VP3S2 et va en décroissant jusqu'à la mutation VP2/S ( $S2 > S1 > S > wt$ ). Une telle accumulation pourrait provenir d'une mauvaise quantification des ADNs lors de la transfection. En effet, la quantité d'ADN récupérée lors de l'extraction cellulaire des molécules d'ADN de faible poids moléculaire est reliée à la quantité d'ADN transfectée. Cependant, il faut mentionner que nous avons vérifié nos quantifications, et nos vérifications nous ont indiqué que cette explication ne s'applique pas ici. On peut donc avancer ici que cette variation de l'accumulation des précurseurs pourrait être une conséquence de l'efficacité réduite de conversion des RmIs en P155.

Les molécules RmI mutées produisent également moins de produit de conversion que la molécule RmIwt (figure 9B et 9C). Afin de s'assurer de l'importance de cet effet, des rapports densitométriques entre l'accumulation du produit de recombinaison (P155) et son précurseur (RmI) ont été effectués. Comme le montrent les résultats des figures 10B et 10C, les taux de conversion RmI en Py des mutants sont en moyenne 9 fois moins élevés que ceux de la molécule sauvage RmIwt. Notons ici que nous nous basons sur les résultats de trois à cinq expériences effectuées à des moments différents, mais selon des conditions identiques.

Les mutations introduites dans la séquence codante des protéines VP2 et VP3 semblent donc engendrer des phénotypes de recombinaison et d'accumulation différents

## Figure 9. Effets des mutations des protéines mineures sur la recombinaison de RmI.

### A. Positionnement des mutations dans la région tardive

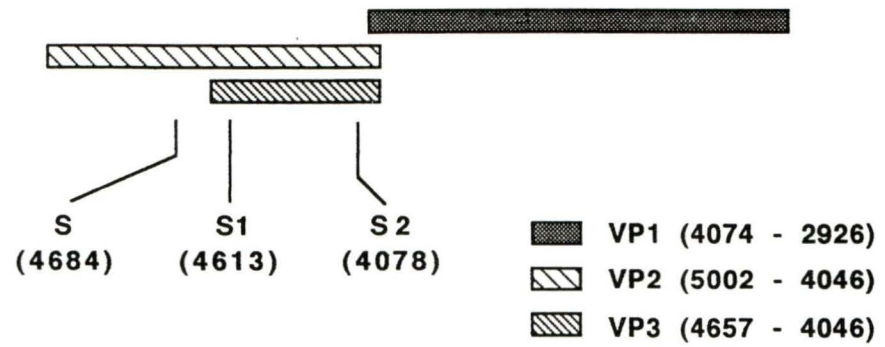
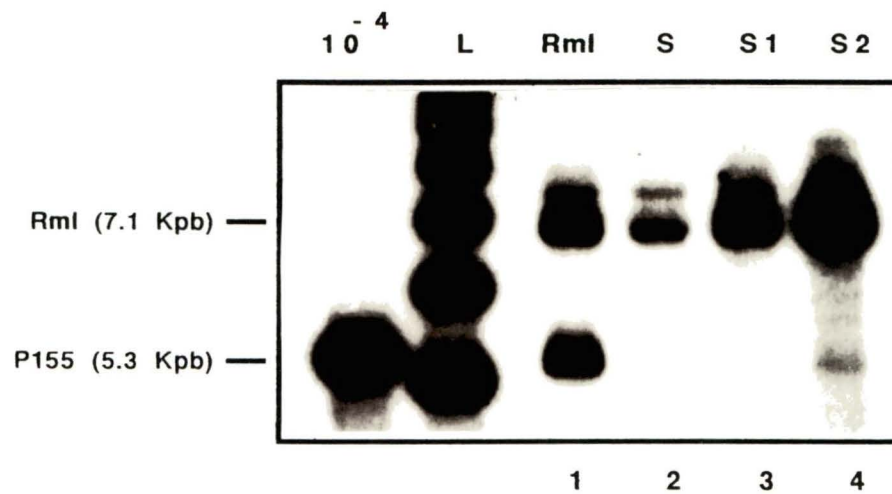
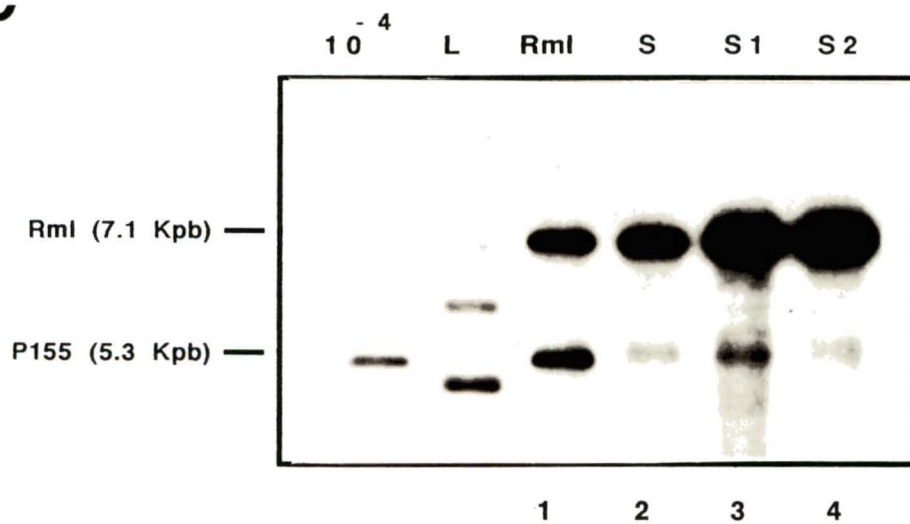
Ce schéma représente la portion codante des gènes tardifs. La position des mutations non-sens VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 est représentée sur ce schéma selon la numérotation nucléotidique du génome de Py. Notez que les coordonnées des gènes VP1, VP2 et VP3 de Py représentent l'une le codon d'initiation (coordonnée A des codons ATG) et l'autre le codon de terminaison (coordonnée T des codons non-sens).

### B. Essai de recombinaison dans les cellules ScopT<sub>1</sub>.

Les constructions RmIwt VP2/S, RmIwt VP2/VP3 S1 et RmIwt VP2/VP3 S2 ont été transfectées dans les cellules ScopT<sub>1</sub>. Les ADN récoltés selon la méthode de Hirt (1967) après 3 jours d'incubation à 37°C, CO<sub>2</sub> 10% ont été soumis à une digestion par *EcoRV*, *Dpn I* et RNase A (Matériel et méthodes). Ainsi linéarisés, les ADN sont déposés sur gel d'agarose 1% et séparés par électrophorèse. Une fois transférés sur une membrane de nylon chargée (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham), les ADN sont hybridés avec une sonde virale radiomarquée complémentaire à l'Ori. Les bandes d'ADN sont alors révélées par autoradiographie. La piste 10<sup>-4</sup> contient 1×10<sup>-4</sup> µg d'ADN de P155 linéarisé par *EcoRI*. L'échelle de référence (piste L) est constituée d'un marqueur de poids moléculaire de 1 Kpb radiomarqué (1 Kb DNA Ladder, Gibco BRL).

### C. Essai de recombinaison dans les cellules 3T6.

Afin de comparer si le type cellulaire influence le taux de recombinaison, les molécules RmIwt VP2/S, RmIwt VP2/VP3 S1 et RmIwt VP2/VP3 S2 ont été transfectées dans la lignée 3T6. Les ADN récoltés selon la méthode de Hirt (1967) après trois jours d'incubation à 37°C CO<sub>2</sub> 10%, ont été traités comme décrit précédemment.

**A**Transcription  
→**B****C**



## **Figure 10. Mesures densitométriques du taux de recombinaison des molécules RmI.**

### **A. Positionnement des mutations dans la région tardive.**

Bien que ce schéma a été présenté auparavant, il permet de faire un lien entre la position des mutations et les différents effets qu'elles entraînent. Ce schéma représente donc la portion codante des gènes tardifs. La position des mutations non-sens VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 est représentée sur ce schéma selon la numérotation nucléotidique du génome de Py. Notez que les coordonnées des gènes VP1, VP2 et VP3 de Py sont indiquées en nucléotide et représentent la première base du codon d'initiation et de terminaison respectivement.

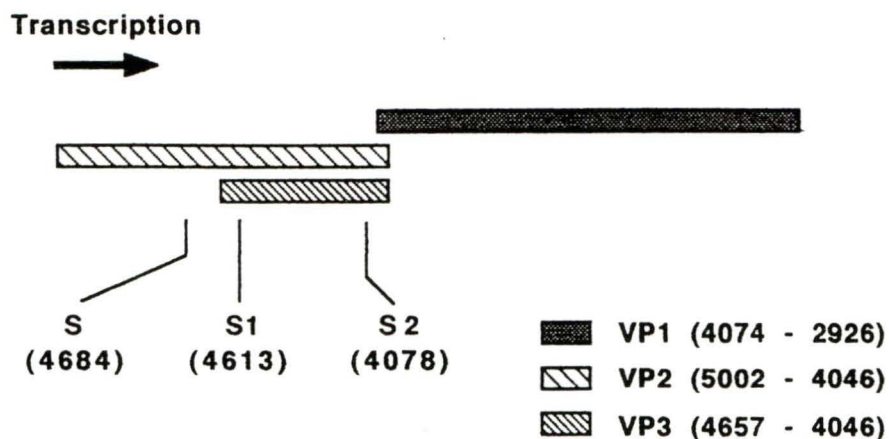
### **B. Résultats densitométriques**

L'évaluation densitométrique de plusieurs expériences a permis d'évaluer le taux moyen de conversion entre les différentes constructions RmI. C'est par la mesure de l'aire sous la courbe de densité provenant de la numérisation des autoradiogrammes que ces données ont été obtenues. Notez que ces valeurs ne possèdent pas d'unité de mesure métrique car le système utilisé ne permettait pas une telle standardisation. Ce problème n'est plus lorsque le rapport entre RmI et P155 est calculé. L'erreur de ces données correspond à l'écart-type entre les valeurs obtenues. On remarque donc par ces mesures que le taux de conversion semble être effectivement affecté par l'introduction de ces mutations dans la région tardive.

### **C. Évaluation du pourcentage de recombinaison des mutants RmI.**

La conversion des valeurs montrées précédemment ( B ) en % permet de mieux cerner l'importance de l'effet des mutations sur les molécules RmI. RmIwt est considérée comme étant la molécule de référence pour le meilleur taux de recombinaison. Le calcul du taux de conversion des autres molécules est alors toujours évalué en rapport à la valeur obtenue pour RmIwt. L'effet des mutations des protéines mineures sur la recombinaison semble être similaire pour les trois types de mutation.

**A**



**B**

**Résultats densitométriques**

Molécule Transfectée	Rml $\bar{x}$	Py $\bar{x}$	Py / Rml
Rml wt	3423 <sup>1</sup>	8124	2.37 ± 1.00
Rml VP2/S	7612 <sup>2</sup>	1620	0.21 ± 0.07
Rml VP2/VP3 S1	11726 <sup>2</sup>	3868	0.33 ± 0.10
Rml VP2/VP3 S2	12042 <sup>1</sup>	2827	0.23 ± 0.05

1 : Moyenne de cinq expériences

2 : Moyenne de trois expériences

**C**

**% de conversion**

Molécule Transfectée	% Rml → P155	
	Rml	P155
Rml wt	100.00	± 42.19
Rml VP2/S	8.86	± 2.95
Rml VP2/VP3 S1	13.92	± 4.21
Rml VP2/VP3 S2	9.70	± 2.11

de ceux de RmIwt. Ces phénomènes ne peuvent être simplement expliqués par une compétition entre RmI et Py pour la réplication, compétition dans laquelle VP2 et/ou VP3 seraient les facteurs de régulation (voir Discussion). Cependant, il est possible que l'accumulation du précurseur RmI est contrôlée par plus d'une fonction virale tardive (en occurrence VP2, VP3 et même VP1) et que pour ce qui est de la conversion de RmI en Py, ou de l'accumulation de Py, un seul facteur pourrait être requis et serait inactivé par la mutation VP2/S.

## **B) Effets des mutations chez la molécule P155.**

Les trois mutations initialement introduites chez RmI ont par la suite été transférées chez RtsP155. Cette opération était nécessaire à la vérification de l'effet que ces mutations pouvaient exercer sur le produit de la recombinaison de RmI. Avec ces nouvelles constructions, nous avons tout d'abord vérifié la capacité d'accumulation des molécules mutantes P155 VP2/S, P155 VP2/VP3 S1 et P155 VP2/VP3 S2, dans la cellule. En effet, il aurait pu se faire que l'inactivation des protéines virales mineures empêcherait ces dernières de "protéger" l'ADN viral par une capside ce qui résulterait en une accélération du turn-over de l'ADN viral, effet susceptible d'être confondu avec une réduction du taux de recombinaison. Ainsi, les molécules P155 mutantes ont été transfectées dans les mêmes conditions que les mutants de RmI. À intervalles, des cultures cellulaires ont été traitées par la méthode de Hirt (1967), leur ADNs étant alors analysés par la méthode Southern comme décrit précédemment (Figure 11).

Afin d'éviter que les variations dans l'efficacité de transfection et/ou dans la récupération des ADN de 5.3 Kpb nous induisent en erreur, on décida de co-transfecter la molécule contrôle pNNOriPy (3.6 Kpb, figure 11) avec nos molécules P155 mutées. Possédant une origine de réplication Py, cette molécule peut non seulement se répliquer dans les cellules de souris, mais également être détectée par la sonde virale Ori. La co-transfection des mutants Py avec pNNOriPy a permis de constater qu'il y avait de réelles différences d'accumulation entre les mutants Py. On remarque que de 24 heures à 3 jours, les molécules mutantes tardives de P155 ne semblent pas avoir de problème à maintenir leur concentration intracellulaire. C'est plutôt entre le troisième et le cinquième jour que l'on constate les modifications de la concentration de certaines molécules. Effectivement, on remarque que la bande à 3.6 Kpb diminue d'intensité remarquablement et ce pour tous les échantillons. On assiste également à la disparition de la bande de 5.3 Kpb pour le mutant P155VP2/VP3 S2, qui s'était déjà estompée au troisième jour (Figure 11B, pistes 4). Pour ce qui est de la molécule sauvage (pistes 1), son accumulation croissante engendre une bande à 5.3 Kpb d'une intensité qui surpasse celles des autres échantillons.

On remarque également que la modification des protéines VP2 et VP3 semble diminuer légèrement l'accumulation des molécules de P155 en rapport à la molécule de type sauvage. Il a déjà été démontré que la présence des protéines mineures est importante pour la structure de la capsid (Griffith et al., 1992; Chen et al., 1998). Leur altération entraîne cependant une diminution et non une inhibition de l'infectiosité des particules virales (Cole et al., 1977; Krauzewicz et al., 1990). La disparition de la bande à 3.6 Kpb (pNNOriPy) et la persistance des bandes à 5.3Kpb des molécules

## **Figure 11. Effets des mutations non-sens sur l'accumulation des molécules P155.**

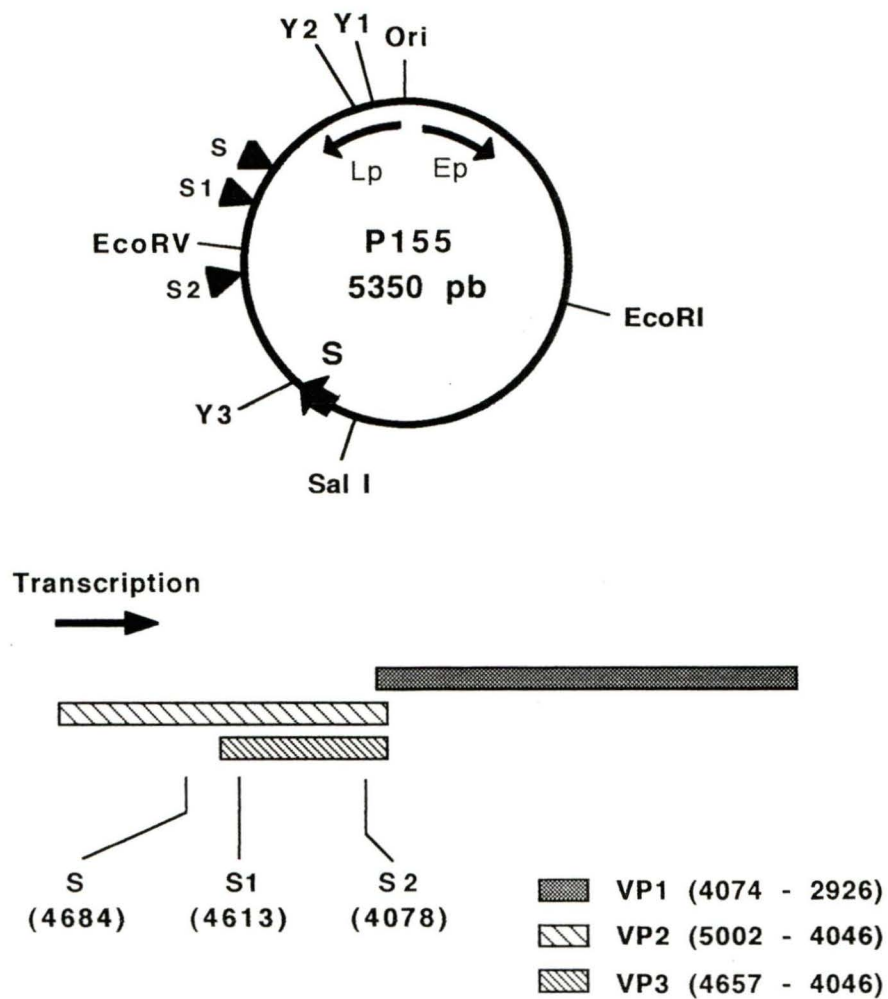
### **A. Positionnement des mutations de la région tardive chez P155.**

Les mutations ont été transférées des mutants RmI vers la molécule RtsP155 (voir figure 6). Produisant les mêmes modifications au niveau des protéines tardives que pour la molécule RmI, le transfert des mutations a permis de sonder leur influence sur la molécule P155. Le schéma représente la position des mutations sur la molécule P155 ainsi que sur les gènes tardifs.

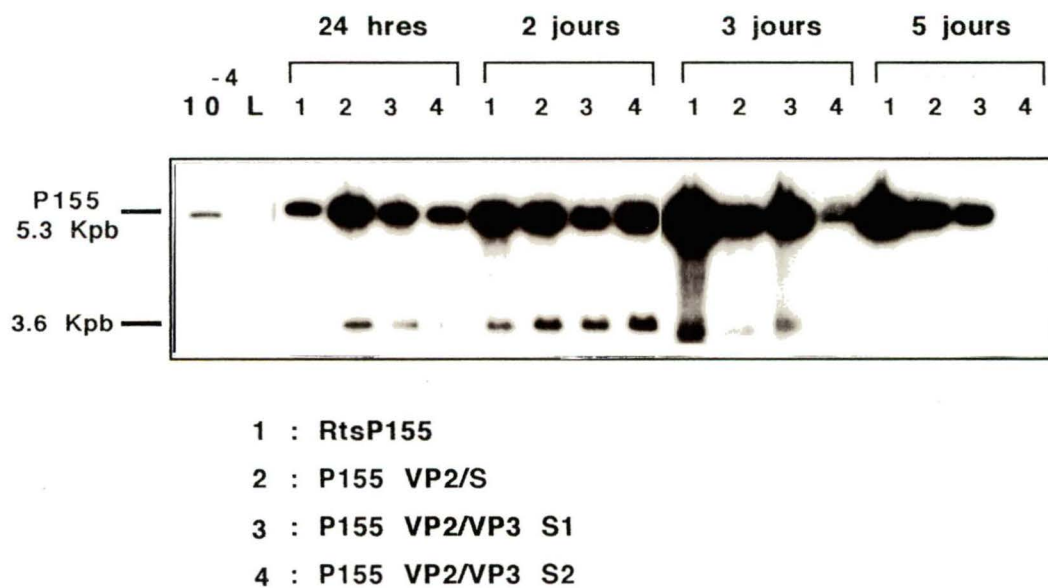
### **B. Capacité d'accumulation des molécules P155 mutées.**

Les constructions P155 VP2/S (pistes 2), P155 VP2/VP3 S1 (pistes 3) et P155 VP2/VP3 S2 (pistes 4) ont été transfectées dans les cellules ScopT<sub>1</sub>. Les ADN ont été récoltés selon la méthode de Hirt (1967) et à différents moments de façon à bien visualiser l'accumulation dans le temps. Les échantillons d'ADN utilisés pour le buvardage Southern ont été traités comme décrit précédemment. Également hybridées avec une sonde virale radiomarquée complémentaire à l'origine de Py (sonde Ori), les membranes ont été autoradiographiées. La piste 10<sup>-4</sup> correspond à 1×10<sup>-4</sup> µg d'ADN de P155 linéarisé par *EcoRI*. La piste L contient le marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA ladder (Gibco BRL) radiomarqué. Notez la présence de la molécule contrôle pNNOriPy (3.6 Kpb) qui possède une origine de Py donc pouvant d'être hybridée par la sonde Ori radiomarquée.

**A**



**B**



RtsP155, P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 de la figure 11B correspond probablement à la mort des cellules transfectées, à leur décollement du tapis cellulaire et à la ré-infection des cellules avoisinantes. La molécule pNNOriPy, incapable de passer d'une cellule à l'autre est alors perdue, tandis que les molécules RtsP155, P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 semblent toutes trois en mesure de se propager. On suspecte néanmoins que les mutants P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 sont incapables d'effectuer plus d'un, ou de deux passages de cellule à cellule, car l'intensité des bandes 5.3Kpb à 5 jours (pistes 2 et 3 ) est plus faible que pour la molécule RtsP155.

Ces résultats nous permettent de conclure que les ADN des molécules P155 mutées persistent suffisamment longtemps dans nos cellules et que les molécules P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 pourraient assurer une propagation virale limitée.

### **C) Production d'hémagglutinine**

L'hémagglutination fournit une technique rapide et fiable pour quantifier les suspensions de virus du polyome. Elle fait appel à la capacité d'association du virus du polyome à certains récepteurs présents sur les globules rouges d'origine murine. Leur association aux globules rouges engendre alors une agglomération que l'on nomme hémagglutination. Cette technique de quantification nous renseigne sur la capacité du génome viral à spécifier des protéines tardives capables de s'assembler en capsomères et de former une capside. Une défaillance au niveau de la structure même des protéines tardives ou bien de leur concentration pourra affecter le titre en agglutinines puisque les capsomères, et les capsides, ne pourront se former adéquatement.

Les mutants tardifs de Py ont alors été transfectés dans les cellules de type ScopT<sub>1</sub>. Le DEAE-dextran a été utilisé comme agent transfectant. Les couches monocellulaires utilisées ont été obtenues par ensemencement des pétris de 100mm avec  $1 \times 10^6$  cellules. Les cultures ont été incubées à 37°C sous une atmosphère de 10% CO<sub>2</sub> et récolté à intervalle. L'extraction du virus s'est faite selon la méthode de Crawford (1962 ; voir matériel et méthodes). La mesure d'un titre viral par hémagglutination nécessite la dilution d'une portion de l'échantillon. On ajoute les globules rouges dans les puits pour ensuite incuber les plaques à hémagglutination pendant 2 heures à 4°C. La dernière dilution donnant une agglutination nous donne le titre en agglutinines.

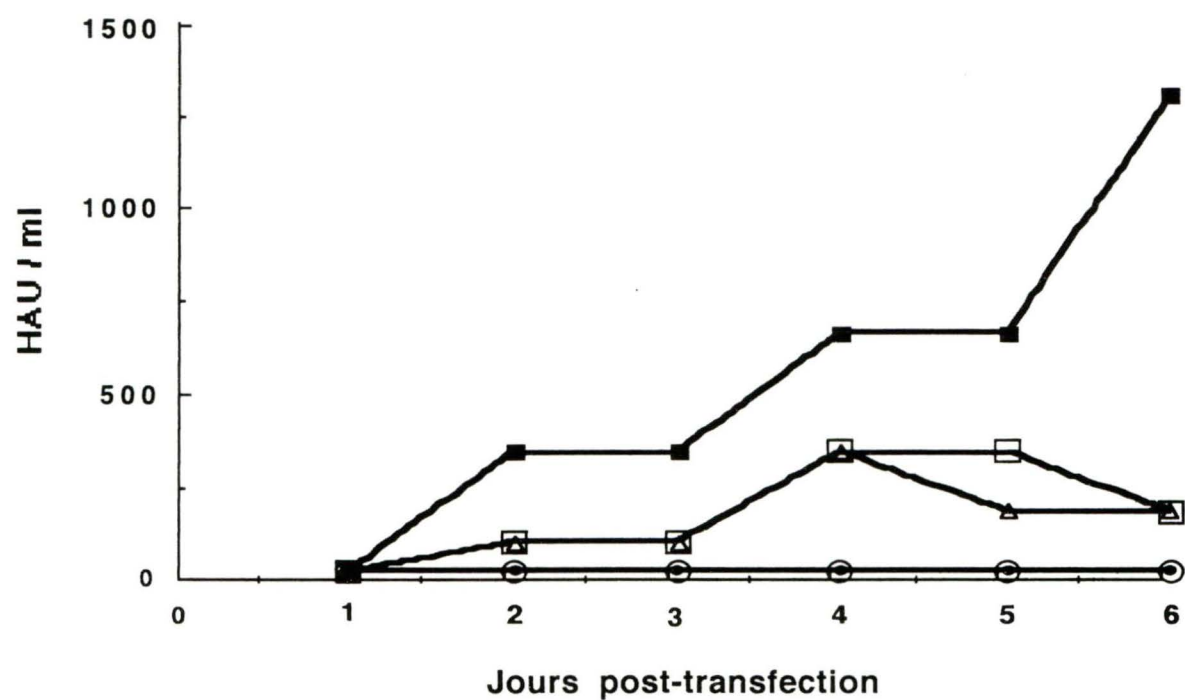
La figure 12 démontre les courbes de titrages ainsi obtenues. Une des premières caractéristiques que l'on peut observer sur ces courbes de titrage est la tendance sinusoïdale de RtsP155, démontrant un plateau à 2 et 3 jours ainsi qu'un autre à 4 et 5 jours. Les ascensions notées entre les jours 1 et 2, 3 et 4, 5 et 6 identifient présumément le premier cycle, second cycle et le troisième cycle de maturation virale. Pour les molécules mutées, les changements de titre sont réduits ou absents, voire inversés (voir par exemple 5 et 6 jours pour P155VP2/VP3 S1). Effectivement, on remarque pour les molécules P155 VP2/S et P155 VP2/VP3 S1 le premier et le deuxième cycle viral, quoique retardés par rapport à RtsP155, semblent bien se dérouler. Au contraire, pour les molécules P155 VP2/VP3 S2 ainsi que P155NCVP1, aucun titre n'est observable. Les mutants S et S1 semblent donc posséder la capacité de produire des particules virales et démontrent un profil de production d'agglutinine suggérant la formation de virions, au moins pour un cycle. En effet, les agglutinines produites entre le troisième et le quatrième jour pourraient consistées surtout en particules vides. Cependant, la



**Figure 12. Analyse de la capacité des molécules P155 mutantes à hémagglutiner.**

Les molécules P155VP2/S, P155VP2/VP3 S1 et P155VP2/VP3 S2, ainsi que les contrôles RtsP155 et P155NCVP1, ont été transfectés sur une monocouche de cellules 3T6. Le contrôle d'hémagglutination négatif, P155NCVP1, détermine la synthèse d'une protéine tronquée capable de former des pentamères ou capsomères; toutefois ces capsomères ne peuvent s'ancrer les uns aux autres et sont donc incapables de former des capsides stables. Après une incubation, les agglutinines sont extraites des cellules par un traitement à la neuraminidase (RDE). Ces agglutinines sont titrées selon la méthode de dilution limite (Matériel et méthodes; Crawford, 1969; Bourgaux 1964). Les titres en HAU/ml ainsi obtenus sont mis en graphique en fonction du nombre de jour suivant la transfection des molécules. On constate alors que les mutants P155VP2/S ainsi que P155VP2/VP3 S1 développent une capacité réduite à hémagglutiner, tandis que la molécule P155VP2/VP3 S2 n'en possède aucune.

# Titres viraux des mutants de type P155



## Légende

- Rts P155
- P155 NCVP1
- P155 VP2/S
- △ P155 VP2/VP3 S1
- P155 VP2/VP3 S2

diminution du titre des mutants P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 à 4 et 5 jours reflète clairement leur incapacité à promouvoir des cycles successifs. La nature de l'handicap particulièrement lourd de P155VP2/VP3 S2 sera discuté plus loin. Le contrôle négatif utilisé pour cette expérience est la molécule P155 NCVP1 élaborée par notre laboratoire (Matériel et méthodes). P155 NCVP1 contient une mutation ponctuelle en C-terminal de VP1, tronquant ainsi les 26 derniers acides aminés de la protéine majeure de structure. Cette mutation détermine la synthèse d'une protéine tronquée capable de former des pentamères ou des capsomères; toutefois ces capsomères ne peuvent s'ancrer les uns aux autres et sont donc incapables de former des capsides stables.

Les essais d'héماغglutination avec les molécules P155VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 concordent avec la cinétique d'accumulation des ADN de P155 présentée précédemment. Notons à ce propos que la méthode de Hirt ne permet de récupérer que l'ADN viral présent dans les cellules adhérant toujours à la surface du pétri (Figure 11B), alors que le titrage d'agglutinines (figure 12) nous restitue la totalité du matériel viral présent dans le pétri. Cette différence explique en partie les écarts quantitatifs plus marqués notés avec la seconde méthode.

Des passages cellulaires ont également été effectués avec les mutants P155 VP2/S et P155 VP2/VP3 S1 et P155 VP2/VP3 S2 sur des cellules ScopT<sub>1</sub> et 3T6 (figure 13). Un passage cellulaire est en fait l'infection de nouvelles cellules par un extrait viral (extraction RDE, voir Matériel et méthodes) provenant d'une culture de cellules précédemment infectées par du virus ou bien transfectées avec de l'ADN viral. Le principal but de cet essai était de voir la capacité des molécules P155 mutées à se

propager lors de passages cellulaires. Bien que cette expérience ait été reprise plusieurs fois, les mutants P155 VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 n'ont jamais montré de titres croissants même après trois passages. La récolte post-tranfection, soit après les premiers 7 à 11 jours d'incubation, montre un titre pour les molécules RtsP155, P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 (figure 13). On observe dès le premier passage une chute des titres d'héماغglutination pour les molécules mutées, représentant l'incapacité des particules virales incomplètes à pouvoir infecter les cellules aisément. Les molécules P155VP2/S et P155VP2/VP3 S1 pourraient être alors en mesure d'amorcer un deuxième cycle d'infection (voir figure 12), mais les mutations tardives empêcheraient ces dernières de se propager librement de cellule en cellule et d'effectuer plusieurs cycles successifs.

#### **D) Analyse des protéines tardives par immunodétection (immunobuvardage)**

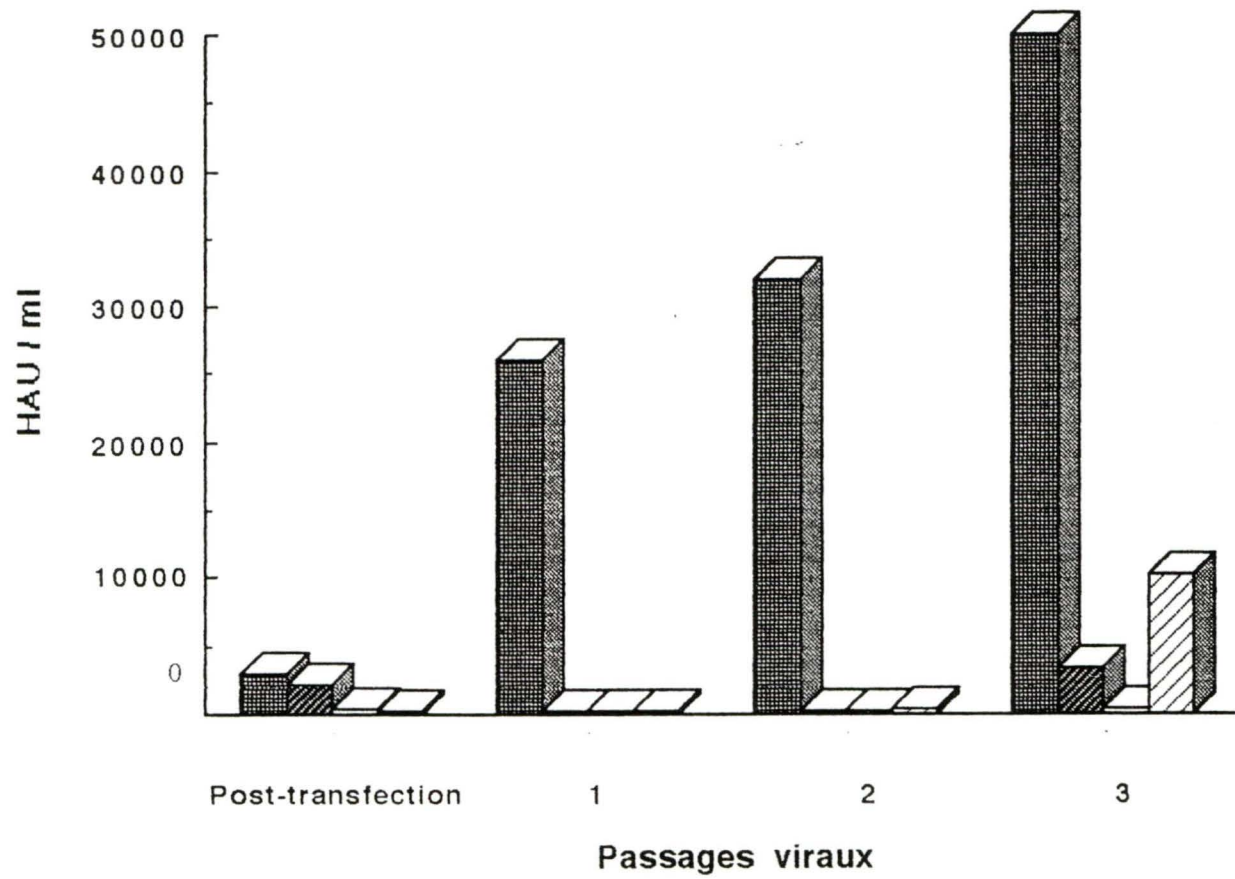
L'analyse des protéines tardives de ces molécules mutées nous a permis de mieux comprendre les observations décrites précédemment. Après avoir obtenu l'antisérum anti-VP1, fabriqué par notre laboratoire, et l'antisérum anti-VP2/VP3 gracieusement offert par le laboratoire du Dr. Richard A. Consigli, les buvardages Western ont pu être effectués.

Nos résultats initiaux utilisaient les lysats cellulaires des cellules ScopT<sub>1</sub> transfectées comme source de protéine pour l'immunobuvardage. Bien que certains résultats satisfaisants aient été obtenus avec cette technique, le bruit de fond résultant de l'association non spécifique de nos anticorps était parfois élevé (résultats non montrés). Ces hybridations non spécifiques par nos anticorps polyclonaux nuisaient à la détection

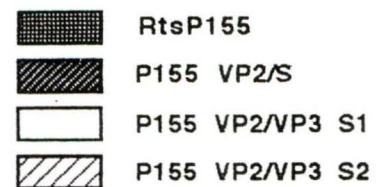
**Figure 13. Effets des mutations non-sens chez P155 sur la propagation virale.**

Les passages cellulaires font appel à la capacité des molécules P155 à réinfecter les cellules environnantes. On cherchait alors à savoir si les constructions mutées de P155 pouvaient passer à un deuxième cycle d'infection. Les molécules P155 VP2/S, P155 VP2/VP3 S1 et P155 VP2/VP3 S2, ainsi que le contrôle RtsP155, ont été transfectées sur une monocouche de cellules 3T6. Après une incubation variant de 7 à 11 jours à 37°C, CO<sub>2</sub> 10%, on récolte les particules virales par un traitement à la neuraminidase (RDE). Notez que la période d'incubation dépend de la condition du tapis cellulaire et de l'effet cytopathogène engendré par le virus. Les particules virales extraites des débris cellulaires sont titrées selon la méthode de dilution limite (Matériel et méthodes; Crawford, 1962; Bourgaux 1964). Selon les titres obtenus en post-transfection, on infecte avec 30 HAU/10<sup>6</sup> cellules ou bien avec la quantité restante de l'extrait viral. Après une autre période d'incubation d'environ 7 jours à 37°C, CO<sub>2</sub> 10%, les pétris sont analysés pour leur contenu en virus (passage # 1). On réextrait le virus par RDE pour le titrer et le réinfecter encore une fois à 30 HAU/10<sup>6</sup> cellules ou bien avec la quantité restante de l'extrait viral (passage #2, etc). Les titres obtenus aux différents passages sont présentés en fonction du nombre de passages. Comme on peut le constater, les mutants P155 sont incapables de passer à des cycles d'infection successifs, comparativement au RtsP155 dont le titre ne cesse de s'accroître. Notez qu'au passage trois un léger titre apparaît pour les molécules P155 mutées. Cependant, des analyses qui ne sont pas présentées dans ce mémoire, montrent que les molécules mutées aux passages 3 sont en faits des révertants qui ont perdus leur mutation.

Passages viraux des  
mutants de type P155



Légende



des faibles quantités de protéines tardives générées par les mutants RmI. Des essais d'immunoprécipitation auraient sans doute pu nous aider à résoudre ce problème. Mais, pour gagner du temps nous avons préféré avoir recours à une méthode originale qui nous a été suggérée par la très grande stabilité du virus du polyome.

En effet, dans la technique de production de virus de Crawford (1962) tout le matériel contenu dans le pétri est concentré par centrifugation après acidification modérée du milieu de culture. Le culot est alors traité au RDE dans un petit volume, puis une clarification est opérée, encore une fois par centrifugation. Ainsi donc obtient-on une concentration importante du matériel viral, comme en témoigne la titration des agglutinines (voir Matériels et méthodes et partie C de la section Résultats). À partir de tels extraits, de loin plus concentrés en protéines virales que les lysats cellulaires, nous avons prélevé le 10µl devant être déposé sur gel. L'addition du tampon de dépôt (voir matériel et méthodes), suivi de l'immersion de l'échantillon dans un bain à 100°C pour trois minutes, suffit à dissocier les capsides virales, et à dénaturer les protéines qui les constituent. Après la migration et le transfert sur membranes PVDF, les protéines de structure sont alors soumises à un premier traitement avec un anti-VP1 ou un anti-VP2/VP3 et révélées ensuite par un anticorps anti-lapin couplé à la HRP. La figure 14B, montre les protéines détectées à 2 et 4 jours après la transfection de cellules ScopT<sub>1</sub> par les molécules RtsP155 (pistes wt), P155 VP2/S (pistes 1), P155VP2/VP3 S1 (pistes 2) et P155 VP2/VP3 S2 (pistes 3).

L'utilisation de l'antisérum anti-VP1 montre clairement la présence de la protéine VP1 pleine longueur dans tous les extraits de 2 et 4 jours excepté celui provenant de la

transfection avec la molécule P155VP2/VP3 S2. Cette molécule ne produisant pas d'hémagglutinines, il n'est pas surprenant de constater une absence de la protéine majeure. Par ailleurs, l'utilisation de l'antisérum anti-VP2/VP3 a permis de démontrer la présence de VP2 et VP3 dans les extraits RDE de cellules transfectées avec RtsP155. Cependant, mis à part l'extrait RDE de la molécule mutée P155VP2/S, aucun extrait provenant des cellules transfectées avec les molécules mutées ne semble contenir de protéines capable de réagir avec l'anti-VP2/VP3. L'extrait viral du mutant P155VP2/S semble contenir la protéine VP3, mais en quantité réduite.

Comme on peut le constater, les résultats obtenus comportent un certain nombre de surprises. Comme on verra plus loin (voir Discussion), toutes sont cependant explicables d'une ou de plusieurs façons. Par exemple, les protéines tronquées peuvent être instables ou non détectables par le sérum utilisé. Et l'absence de VP1 chez les extraits provenant des cellules transfectées par P155VP2/VP3 S2, peut probablement être expliquée par un problème de traduction de l'ARNm (voir Discussion).

Toutefois, le fait que l'analyse ait porté sur des extraits enrichis de particules virales plutôt que représentatifs de toutes les protéines est sans doute sans conséquence. En effet, nos expériences initiales effectuées avec une méthode d'extraction conventionnelle, bien que masquées par beaucoup de liaisons non-spécifiques des anticorps, ne nous avaient pas révélées davantage de protéines virales que celles présentées ici. Notez que la figure 15 résume bien ce que les immunobuvardages nous ont permis de constater au niveau de la production des protéines tardives.



**Figure 14. Analyses protéiques des molécules P155 mutées par immunobuvardage.**

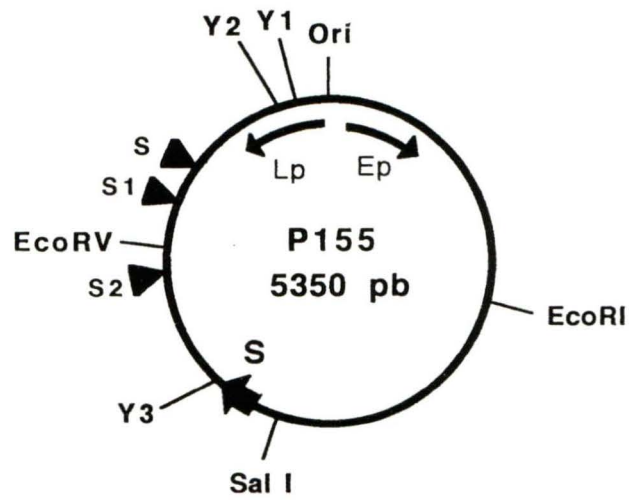
**A. Positionnement des mutations S, S1 et S2 chez P155.**

Le schéma représente la position des mutations sur la molécule P155 ainsi que les modifications apportées au niveau nucléotidique. Ces différents mutants P155, soient P155VP2/S, P155VP2/VP3 S1 et P155VP2/VP3 S2 ont été utilisés pour les immunobuvardages.

**B. Immunobuvardages sur extraits RDE.**

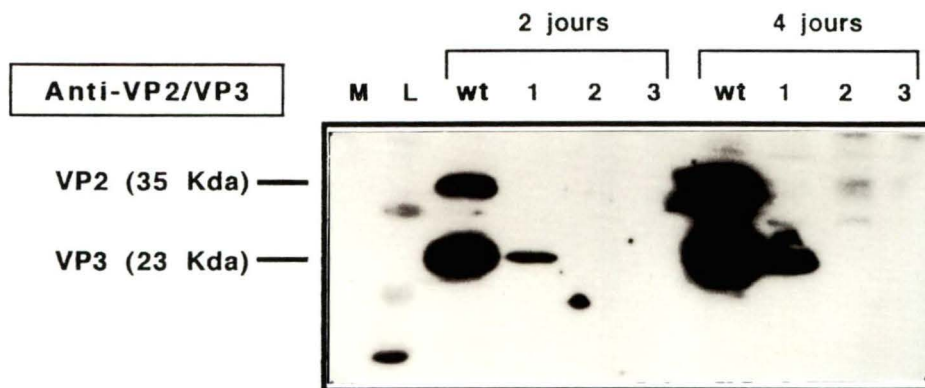
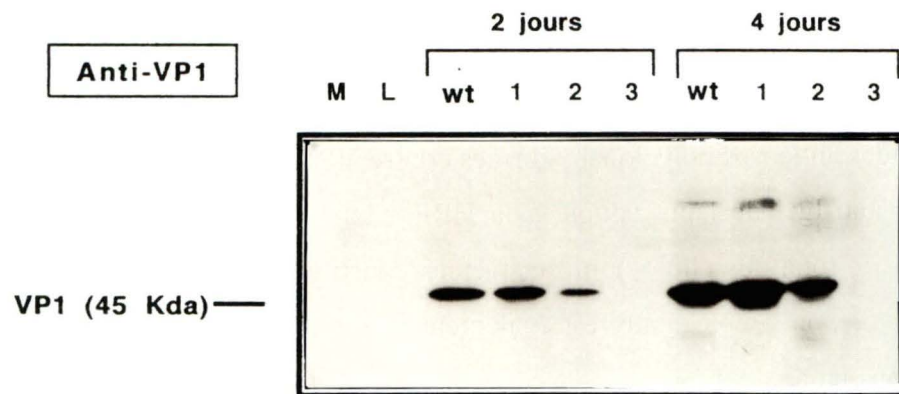
Les molécules P155VP2/S (pistes 1), P155VP2/VP3 S1 (pistes 2) et P155VP2/VP3 S2 (pistes 3), ainsi que le contrôle RtsP155 (pistes wt), ont été transfectées dans des cellules ScopT<sub>1</sub>. Après une incubation de 2 et 4 jours à 37°C, CO<sub>2</sub> 10%, on extrait les particules virales par un traitement RDE. Préalablement au dépôt sur gel d'acrylamide 12% (SDS-PAGE), les échantillons correspondants à 1/10 de pétri sont dénaturés à la chaleur en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et de SDS. Le buvardage de type Western s'effectue sur membrane PVDF (Hybond P, Amersham). Les membranes sont en premier lieu mises en contact avec des anticorps polyclonaux dirigés contre VP1 ou VP2/VP3 et en second lieu par un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la HRP. La révélation s'effectue par ECL. Un extrait cellulaire total de cellule non-transfectées constitue notre contrôle négatif (piste M). Un marqueur de poids moléculaire est également ajouté aux échantillons (piste L, *Rainbow marker*, Amersham).

**A**



G → T (4684) P155 VP2/S  
C → A (4613) P155 VP2/VP3 S1  
G → T (4078) P155 VP2/VP3 S2

**B**



## **Figure 15. Effets des mutations sur les protéines tardives.**

### **A. Positionnement des mutations dans la région tardive de Py.**

Ce schéma permet de positionner certains des éléments importants de la région tardive dont il est discuté dans cette étude. Notez la position des mutations par rapport au signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'au domaine d'interaction à VP1.

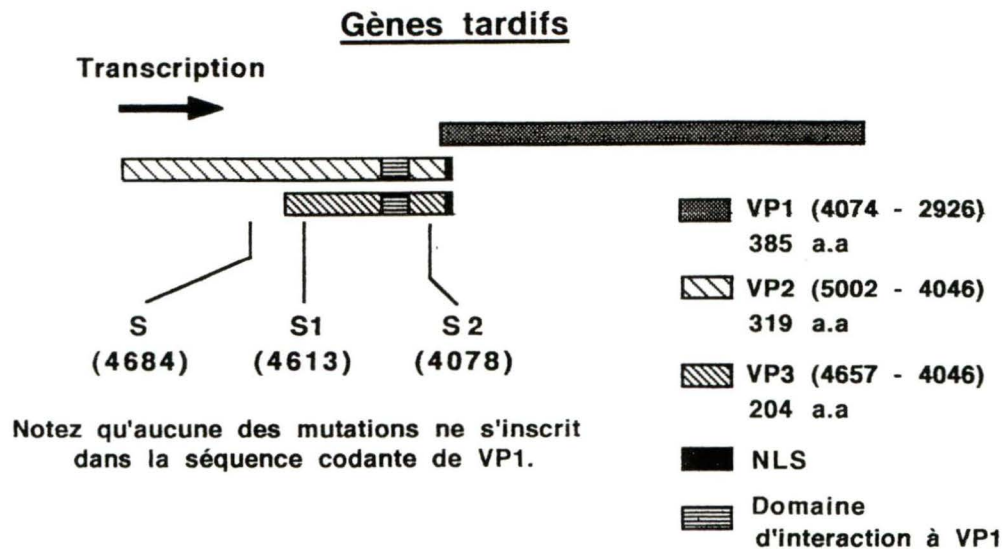
### **B. Protéines attendues par l'insertion des mutations dans la région tardive.**

Ce tableau montre ce que l'on prévoyait comme production protéique lors de l'introduction de mutations dans la région tardive. L'insertion de codons non-sens dans les séquences codantes des différentes protéines tardives devait tronquer certaines protéines permettant ainsi de bien cerner leur rôle au niveau de la recombinaison de RmI. Selon ce que la littérature permettait d'avancer, les tailles des protéines tronquées par les mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 ont été estimées. Les caractéristiques de ces mutations ont également été basées sur les connaissances théoriques de la région tardive.

### **C. Protéines obtenues par l'insertion des mutations dans la région tardive.**

Ce tableau résume l'effet obtenu expérimentalement sur la production des protéines tardives par les mutants de Py. Comme on peut le constater, l'influence des mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 est plus importante que ce qu'on avait prévu en théorie. La taille des protéines tardives détectées chez les mutants est indiquée en Kda du fait qu'elles ont été détectées par immunobuvardage. Notez que contrairement à ce qu'on croyait, le profil de détection des protéines tardives chez les mutants diffère des prévisions théoriques.

**A**



**B**

Mutation	Protéines attendues	Tailles attendues en a.a.	Caractéristiques
VP2 / S	VP2 tronquée VP3 complète	106 204	VP2 est sans NLS et sans domaine d'interaction à VP1
VP2 / VP3 S1	VP2 tronquée VP3 tronquée	129 14	Absence de NLS et du domaine d'interaction à VP1 pour VP2 et VP3
VP2 / VP3 S2	VP2 tronquée VP3 tronquée	308 197	VP2 et VP3 possèdent un domaine d'interaction à VP1, mais n'ont plus de NLS

**C**

Mutation	Protéines détectées	Tailles obtenues en Kda	Caractéristiques
VP2 / S	VP3 VP1	23 45	Absence de VP2
VP2 / VP3 S1	VP1	45	Absence des protéines mineures
VP2 / VP3 S2	aucune	—	Absence des protéines mineures et absence de VP1

## **E) Essais de complémentation des mutants S, S1 et S2 chez RmI et P155**

Les essais de complémentation représentaient une étape essentielle dans l'identification de l'implication des protéines tardives mineures dans la recombinaison chez RmI. En fournissant de façon exogène au génome viral muté (RmI) la protéine native et en quantité suffisante nous permettrait de voir si effectivement la modification apportée est responsable du phénotype observé.

Il y eu une première série de vecteurs d'expression bâtie sur une molécule commercialement disponible. La molécule pEGFP-N1 est un vecteur relativement simple dans lequel on peut cloner un gène encodant une protéine ou bien un polypeptide qui sera fusionné à la protéine de fluorescence verte (EGFP). Notre laboratoire a initialement introduit une origine de répllication Py de façon à assurer la répllication de cette molécule dans nos fibroblastes de souris (figure 16A). Les gènes VP2 et VP3 ont été synthétisés par PCR sur une matrice de P155. Deux sites enzymatiques ont été introduits aux extrémités par les amorces de façon à faciliter le clonage du fragment nucléotidique (voir Matériel et méthodes). Le gène EGFP a alors été excisé du vecteur pEGFP-N1 pour être remplacé par nos fragments représentant la séquence des protéines VP2 et VP3. Une fois amplifiés et quantifiés, ces nouveaux vecteurs d'expression ont été co-transfectés en quantité bien précise avec nos molécules RmI et P155 mutées. Malgré nos multiples essais nous n'avons pu mettre en évidence une quelconque complémentation avec ces vecteurs.

## Figure 16. Vecteurs d'expression protéique de type pCMV.

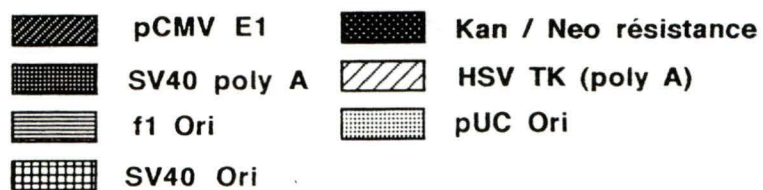
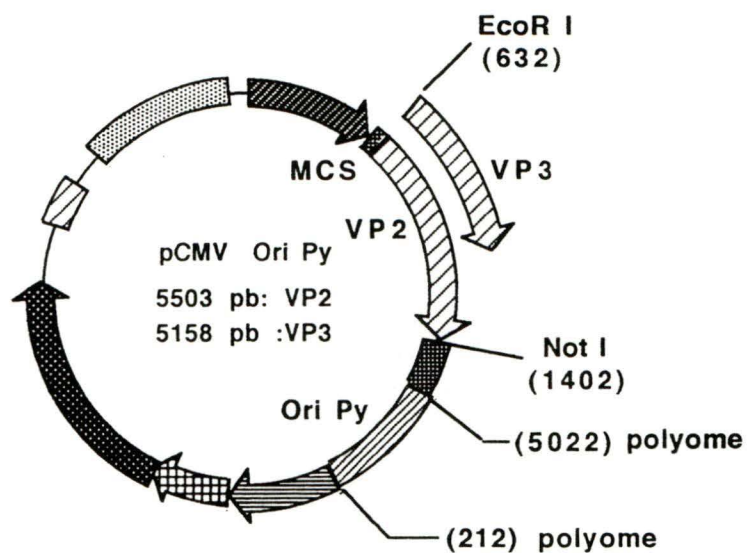
### A. Carte physique des vecteurs de type pCMV OriPy.

Les vecteurs de type pCMV OriPyVP2 et pCMV OriPyVP3, proviennent de la molécule de base EGFP-N1 (voir figure 7). Insérés par clonage moléculaire aux sites *EcoRI* et *Not I* les gènes VP2 et VP3 se retrouvent sous le contrôle du promoteur de CMV. L'origine de Py, insérée au site *Afl II*, permet aux vecteurs de se répliquer dans les cellules de souris utilisées pour cette étude. Grâce à l'origine de répllication procaryotique et à la résistance à la kanamycine, ces molécules peuvent être amplifiées et sélectionnées dans les bactéries compétentes. Notez que la portion plasmidique importante pour l'amplification procaryotique n'est pas excisée avant la transfection.

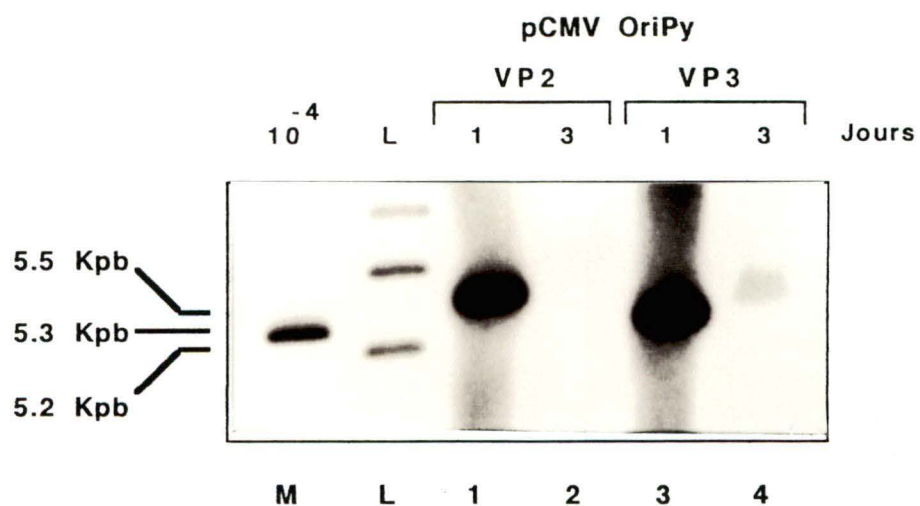
### B. Capacité d'accumulation des vecteurs de type pCMV OriPy.

Les vecteurs pCMV OriPyVP2 (pistes 1 et 2) et pCMV OriPyVP3 (pistes 3 et 4) ont été transfectés seuls dans des cellules de type ScopT<sub>1</sub>. L'expression constitutive des protéines précoces de Py dans les ScopT<sub>1</sub> donne à ces vecteurs les éléments importants pour engendrer leur répllication. Après une incubation de 1 et 3 jours à 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, les ADN sont récoltés selon la méthode de Hirt (1967). Préablement traités par *EcoRI*, *DpnI* et la Rnase A, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1%. Le buvardage Southern s'effectue tel que décrit précédemment et la membrane est hybridée avec une sonde virale radiomarkée (sonde Ori). L'origine de répllication de Py qui a été introduite dans ces vecteurs, permet une hybridation avec la sonde d'ADN viral. La disparition importante à 3 jours du vecteur pCMV OriPyVP2 (piste 2) ainsi que du vecteur pCMV OriPyVP3 (piste 4) font d'eux des vecteurs inappropriés pour nos essais de complémentation.

**A**



**B**



Bien qu'initialement très prometteur, ces vecteurs présentaient plusieurs anomalies. Premièrement, nous avons vérifié leur capacité à persister dans notre système cellulaire. Ils ont donc été transfectés seuls dans nos cellules ScopT<sub>1</sub>, dans lesquelles le grand T est produit de façon constitutive ce qui a permis leur réplication. Comme la figure 16B démontre, leur accumulation est passablement faible voir décroissante. Après seulement trois jours d'incubation nos vecteurs d'expression ont totalement disparu des cellules. Cette disparition rapide peut probablement être associée non seulement à une dégradation nucléolytique, mais également à une défaillance au niveau de la réplication des vecteurs. D'autant plus que des essais de buvardage Western (résultats non présentés) n'ont jamais réussi à mettre en évidence la production des protéines mineures même sous des temps d'incubation courts. L'idée de l'utilisation de ces molécules comme vecteurs de complémentation a alors été abandonnée.

Une autre stratégie a alors été employée pour élaborer de nouveaux vecteurs. Essentiellement basé sur l'utilisation directe de la portion tardive et de l'origine du génome de Py, ces vecteurs d'expression devaient présenter des caractéristiques similaires à nos molécules de type sauvage. Comme le montre la figure 17A, le vecteur de base utilisé pour sa capacité à produire les trois protéines est constitué d'une portion plasmidique (pNN) liée aux sites enzymatiques *Sal I* à 2862 et au site *Sal I*, généré par PCR, à 112 en passant évidemment par l'origine (voir Matériel et méthodes). De cette molécule de base découlèrent plusieurs vecteurs spécifiques. L'expression des protéines tardives étant assurée par le promoteur tardif ces vecteurs allaient répondre aux exigences temporelles et quantitatives de Py, ce que les pCMV ne pouvaient accomplir. Bien que les vecteurs possèdent les trois gènes, un changement de cadre de lecture pour le gène



VP1 et des mutations ponctuelles pour les gènes VP2 et VP3 nous permettent l'expression sélective des protéines tardives.

Afin de vérifier leur capacité de s'accumuler, les différents vecteurs d'expression de type pLRP exempts de pNN ont été transfectés dans les cellules ScopT<sub>1</sub>. L'incubation à 37°C, dans une atmosphère contenant 10% CO<sub>2</sub> s'est prolongée jusqu'à trois jours avant de récolter les ADN selon la méthode de Hirt (1967). Comme la figure 17B démontre, les ADN des vecteurs persistent dans les cellules ScopT<sub>1</sub> et ce, même après 3 jours. Différentes combinaisons de vecteurs d'expression étaient susceptibles d'être co-transfectés avec les molécules mutantes RmI. L'analyse de la capacité d'accumulation a alors été effectuée pour les mutants seuls tels pLRP, pVP1, pVP2 et pVP3 (pistes 1, 2, 3 et 4 respectivement) ou en co-transfection tels pVP1/pVP2 et pVP1/pVP3 (pistes 5 et 6). On a remarqué cependant, lors d'essais antérieurs, que l'accumulation des vecteurs d'expression est inférieure à l'accumulation de l'ADN de Py (résultats non montrés). Effectivement, l'absence totale de la région précoce contribue probablement à diminuer les taux de réplication et ainsi d'accumulation de ces molécules.

Les essais d'immunobuvardage ont démontré que ces molécules produisaient une quantité plutôt faible de protéines tardives (figure 17C). Même la molécule pLRP, dont les gènes tardifs sont exempts de mutation, montre une production faible de protéines (piste 3). Contrairement aux molécules RtsP155, les vecteurs d'expression de type pLRP ne peuvent s'encapsider et s'amplifier grâce à d'autres cycles d'infection, ce qui contribue probablement à cette faible production protéique. Pourtant élaborés selon la structure de la région tardive du virus du polyome, les vecteurs d'expression ont peine à

## Figure 17. Vecteurs d'expression de type pLRP.

### A. Carte physique des vecteurs de type pLRP.

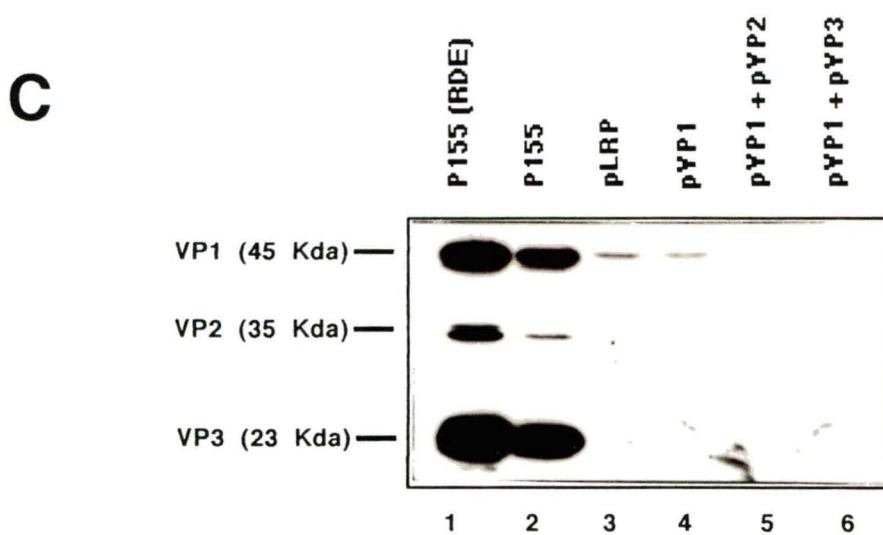
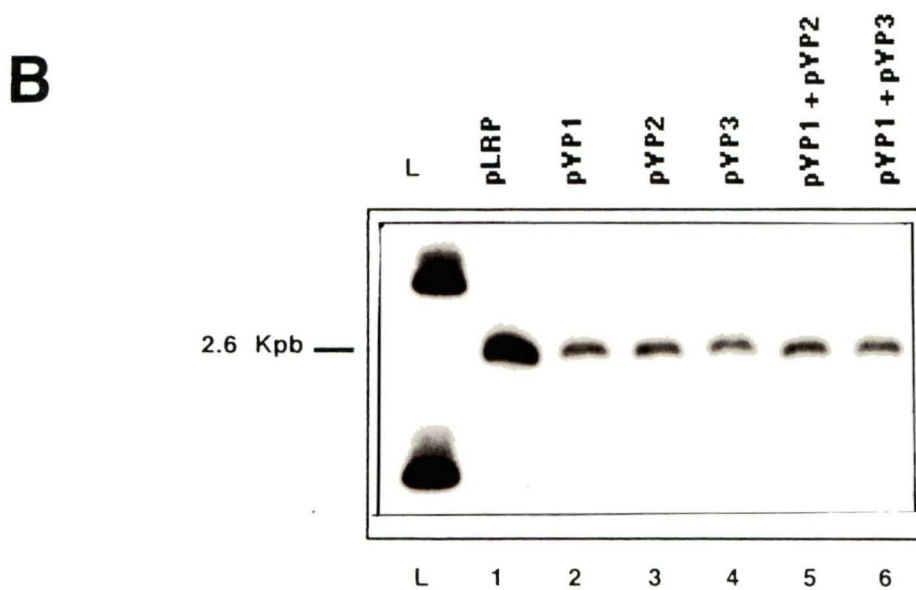
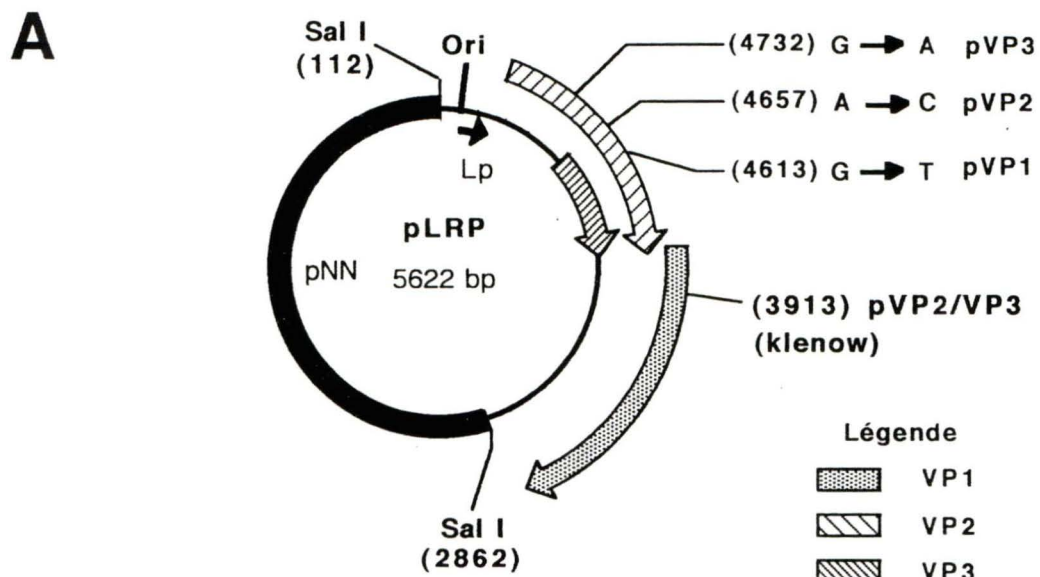
Tel que décrit précédemment, l'élaboration des vecteurs d'expression pVP2/VP3, pVP2, pVP3 et pVP1 proviennent de la molécule de base pLRP (voir figure 8). Les différentes modifications apportées aux portions codantes sont indiquées clairement sur la molécule. Le vecteur plasmidique pNN est excisé des vecteurs de type pLRP avant toutes transfections.

### B. Capacité d'accumulation des molécules de type pLRP.

Les vecteurs d'expression de type pLRP sont transfectés dans des cellules de type ScopT<sub>1</sub>. Les échantillons sont récoltés après 3 jours d'incubation à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, selon la méthode de Hirt (1967). Les échantillons sont traités par *EcoRV*, *DpnI* et RNase A avant leur déposition sur gel d'agarose 1%. Le buvardage de type Southern est effectué comme décrit précédemment et la membrane est hybridée avec une sonde virale radiomarquée (Sonde Ori). La membrane est alors révélée par autoradiographie. La piste L contient le marqueur de poids moléculaire 1 *Kb DNA ladder* radiomarqué (Gibco BRL).

### C. Analyse de la production protéique des vecteurs de type pLRP.

Les vecteurs pLRP, pVP1, pVP2 et pVP3 ont été transfectés dans des cellules ScopT<sub>1</sub> de façon à voir leur capacité à produire les protéines virales attendues. Après une incubation de 3 jours les cellules sont lysées avec le tampon RIPA pour en extraire les protéines totales (Matériel et méthodes). Le buvardage Western ainsi que la révélation ont été effectués comme décrit précédemment. Les protéines de P155, provenant d'une extraction protéique totale (piste 2) et d'une extraction RDE (piste 1) sont utilisées comme contrôle interne. L'accumulation des protéines mineures est plus faible lorsqu'elles sont exprimées seules, leur co-expression avec VP1 permet normalement d'augmenter leur stabilité (pistes 5 et 6).



produire des protéines tardives. De multiples essais de transfection et de mise au point n'ont malheureusement pas permis d'améliorer leur capacité d'expression.

Des essais de co-transfections ont alors été tentés malgré le fait que les vecteurs ne produisaient que peu de protéines. Pour ces essais, nous avons fait abstraction du poids des vecteurs plasmidiques (pNN) lors du calcul des quantités des molécules RmI, ou RtsP155, et des vecteurs d'expression. Effectivement, le vecteur plasmidique contribue pour environ 50% du poids de nos vecteurs d'expression de type pLRP. En faisant abstraction du vecteur plasmidique, on s'assurait ainsi de l'exactitude du rapport des poids entre le complément (vecteur d'expression) et les molécules complémentées (mutants RmI ou RtsP155).

Initialement, les molécules RmIVP2/S, RmIVP2/VP3 S1 ainsi que RmIVP2/VP3 S2 ont été complémentées avec plusieurs combinaisons de vecteurs d'expression. On tentait donc de redonner au système les protéines que la molécule mutée ne pouvait exprimée. Malgré les multiples combinaisons effectuées, les essais de co-transfection n'ont pu permettre aux molécules mutées de type RmI de retrouver le phénotype sauvage. Des modifications dans les temps de récolte ainsi que dans la technique de transfection n'ont malheureusement rien apporté à ces essais. Bien que l'on suspectait l'expression affaiblie des vecteurs d'expression, les essais de complémentation par co-transfection devaient tout de même être tentés.

## **Discussion**

### **A) Phénotype des mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2**

Trois mutations principales ont été introduites chez la molécule RmI ainsi que dans RtsP155 comme il a été décrit précédemment. Les mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 amènent des codons non-sens au niveau des ARNm des protéines mineures. Afin de bien comprendre comment et pourquoi l'effet observé au niveau de la recombinaison de RmI est si important, il nous faut bien mesurer l'impact de ces mutations sur les protéines tardives.

L'effet de la mutation VP2/S, située à 4684, devait être de tronquer VP2, limitant ainsi sa taille à 106 a.a., tout en laissant bien sûr intacte la protéine VP3. Limité à cet effet sur la traduction, la mutation VP2/S devait nous permettre d'étudier le rôle de VP3 et de VPX au niveau de la recombinaison. Ou inversement, elle allait nous permettre d'étudier la recombinaison en absence de VP2. En effet, le segment de 106 a.a de VP2 n'étant porteur ni de son NLS et ni de son domaine de liaison à VP1, ne serait probablement pas transporté au noyau et sans doute dégradé. Une autre possibilité serait que le fragment VP2 de 106 a.a., ne possédant plus sa partie C-terminale, ait perdu une région immunoréactive importante ce qui empêcherait sa révélation par l'anti-VP2/VP3. De toute manière, les immunobuvardages que nous avons effectués à partir des extraits viraux ne nous ont pas permis de détecter un VP2 tronqué. L'effet de VP2/S ne se limite cependant pas à la traduction de l'ARNm de VP2. En effet, VP3 bien que détectable après transfection par P155VP2/S, semble présent en quantité réduite (figure 14 et 15).

Cette réduction pourrait indiquer qu'une mutation introduite à 4684 est susceptible d'interférer avec la stabilité de la structure secondaire localisée en 5' de l'ARNm de VP3 (Soeda et al., 1980). Toutefois on ne peut exclure que la réduction du rapport VP3/VP1 notée à la figure 14B (pistes 1 jours 2 et 4) soit un effet secondaire de l'absence de VP2 dans la particule virale.

Que la protéine VP3 soit exprimée normalement ou faiblement, la mutation VP2/S est celle parmi les trois mutations caractérisées qui nous apporte le plus d'information. En effet, cette mutation montre une inhibition de la recombinaison de RmI tout aussi importante que celle engendrée par la disparition complète de VP2 et de VP3 (mutation VP2/VP3 S1) ou des trois protéines de structures VP1, VP2 et VP3 (mutation VP2/VP3 S2). En particulier, il est intéressant de noter qu'en inactivant les fonctions de la protéines VP2, on affecte autant la recombinaison qu'en inactivant VP2 et VP3 (figure 10B).

La mutation VP2/VP3 S1, située à 4613, tronque les deux protéines mineures. La présence d'un codons non-sens à cette position ne permet en théorie que la traduction des 129 premiers acides aminés de VP2 et les 14 premiers de VP3 (figure 15). Les essais d'immunobuvardages n'ont pas permis de révéler ces tronçons de protéines mineures chez les extraits provenant des cellules transfectées avec P155VP2/VP3 S1. Le peptide de 14 a.a. attendu est probablement trop court pour être détecté par les méthodes utilisées. D'autant plus que ce fragment n'a aucune chance d'être successivement transféré au noyau et incorporé aux particules virales. En ce qui concerne le fragment peptidique VP2 de 129 a.a., la perte de la portion C-terminale contribue probablement à son absence dans les extraits. Effectivement, la perte du domaine d'interaction a VP1 nuit certainement à

sa récupération par extraction virale. Bien que l'on présume qu'un tel fragment de VP2 soit traduit dans la cellule, les méthodes expérimentales utilisées ne semblent pas permettre sa détection.

Que ces formes de VP2 et de VP3 soient détectables ou non, il n'est pas déraisonnable d'assumer que les fonctions des gènes VP2 / VP3 sont totalement ou partiellement inactivées par la mutation VP2/VP3 S1. Ceci n'empêche cependant pas les ADN de RmIVP2/VP3 S1 et P155VP2/VP3 S1 de se répliquer et de s'accumuler quasi normalement dans les cellules de souris. La construction P155VP2/VP3 S1 produit également des hémagglutinines virales dont les titres sont stables et relativement élevés après cinq jours post-transfection. Ces données semblent suggérer que P155VP2/VP3 S1 s'accumulerait normalement après transfection et pourrait donner des particules virales de faible pouvoir infectieux.

Située à 4078, c'est-à-dire à proximité de l'extrémité 3' de la séquence codante à la fois pour VP2 et VP3, la mutation VP2/VP3 S2 avait été créée pour juger de l'effet obtenu en soustrayant les 10 dernières a.a. des deux protéines mineures, incluant le signal de localisation nucléaire. Que P155VP2/VP3 S2 ne produise pas d'agglutinine paraissait donc surprenant (voir figure 12 et 13). Cependant, les essais de détection par immunobuvardage utilisant le sérum anti-VP2/VP3 indiquaient l'absence des protéines mineures dans les extraits RDE provenant des cellules transfectées avec P155VP2/VP3 S2 (figure 14B). On était pourtant certains de l'immunoréactivité de ces protéines tronquées de 10 a.a. puisqu'il a été démontré que l'anti-VP2/VP3 utilisé pouvait réagir avec une protéine VP2 ayant perdu 12 a.a. C-terminaux (Cai et al., 1994). Cependant,

l'absence des protéines VP2 et VP3 dans les extraits RDE pourrait être sans relation avec une modification de leur portion terminale. En effet, les extraits RDE provenant des cellules transfectées avec P155VP2/VP3 S2 semblent être exempts de VP1 (figure 14B).

Une façon d'expliquer ce phénomène consiste à faire appel à la collaboration des NLS entre VP1 et VP2 ou VP1 et VP3 pour le transport au noyau. Bien que VP1 seul se rend au noyau, la présence d'une protéine mineure n'ayant plus de NLS dans la cavité axiale des pentamères pourrait nuire au transport de VP1. Les complexes étant alors probablement retenus dans le cytoplasme seraient dégradés massivement. Par ailleurs, la stabilité de l'ARNm de VP1 pourrait être compromise par la mutation VP2/VP3 S2. Effectivement, l'ARNm de VP1 forme à son extrémité 5' une structure secondaire de type épingle à cheveux (Soeda et al., 1980). Cette structure, précédant le site d'initiation de la traduction, pourrait être impliquée dans les événements de "processing" menant à l'ARNm mature ou bien dans la reconnaissance adéquate du ribosome avec l'ARNm. Notre mutation est localisée de façon telle qu'elle se situe dans la structure secondaire à quatre nucléotides du codon d'initiation de l'ARNm de VP1. Il est possible que ce changement engendre une déstabilisation de la structure secondaire ou bien une inactivation de sa fonction menant ainsi à une diminution ou à une incapacité à se faire traduire. L'ARNm de VP1 ainsi peu ou non fonctionnel est dégradé ne laissant que très peu de VP1 produit. Un manque de la protéine majeure est donc fatal pour les protéines mineures puisqu'elles sont trappées au cytoplasme et ensuite très probablement dégradées. Il est donc peu surprenant de constater que P155VP2/VP3 S2, ne produisant pas de VP1, est le seul mutant Py qui ne donne ni d'hémagglutinine, ni lieu à une propagation de cellule à cellule (figure 12 et 13).



## **B) Effet des mutations sur la conversion de RmI en P155**

Comment les protéines de structure de Py peuvent-elles avoir un rôle sur un mécanisme touchant l'ADN et aussi complexe que celui de la recombinaison? Nos expérimentations effectuées avec les mutants de RmI démontrent effectivement un effet des protéines tardives mineures au niveau de la recombinaison entre les répétitions S. Cependant, l'effet observé dépend très probablement d'une somme ou d'une accumulation d'éléments permettant ainsi la stimulation de la recombinaison.

Les mutations VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 semblent avoir essentiellement le même effet inhibiteur sur la recombinaison de RmI. Effectivement, le tableau des rapports densitométriques (figure 10) montre que les trois mutations donnent sensiblement le même pourcentage de conversion de RmI en P155. Ces valeurs densitométriques n'ont été utilisées qu'à titre d'indice nous permettant d'évaluer les rapports des intensités des bandes obtenues sur les autoradiogrammes des buvardages Southern. Bien que les différentes mutations n'engendrent pas le même profil protéique, le résultat au niveau de la recombinaison semble être pratiquement le même. L'étude effectuée par Maryse Bélanger (Voir Mémoire, 1999) démontre que lorsqu'on empêche VP1 d'accéder au noyau en modifiant son NLS (modification de l'arginine 5), la recombinaison est lourdement affectée. Évidemment, cette expérience ne discrimine pas quelle protéine est importante au niveau de la recombinaison puisque le transport au noyau des trois protéines est ainsi affecté. Les mutants VP2/S, VP2/VP3 S1 et VP2/VP3 S2 viennent raffiner en quelque sorte cette étude. La modification VP2/S apporte un élément important à notre étude. La transfection des molécules RmI a démontré que le

rapport du produit sur le précurseur (mesures densitométriques, figure 10) pour RmIwt est supérieur par un facteur de 10 environ à la molécule RmIVP2/S. Et pourtant, la molécule RmIVP2/S possède la capacité de produire les protéines VP3 et VPX. Ceci laisse alors supposer que VP2 apporterait un rôle important dans la stimulation de la recombinaison. Mais VP2 ne peut agir seul ou en combinaison avec VP3 seulement puisque le transport au noyau serait très affecté (Delos et al., 1993; Forstova et al., 1993). C'est donc probablement une combinaison de VPX et de VP2 qui semble être responsable en majeure partie de cette stimulation. Rien ne nous prouve cependant que l'absence de VP3 seulement dans le système n'aurait pas d'effet sur la conversion de RmI en P155. Effectivement, la présence de la protéine mineure VP3 et la conservation de son gène au cours de l'évolution suggère une importance dans les fonctions virales. Les fonctions remplies par VP3 pourraient ne pas être totalement assurées par VP2 ce qui se répercuterait probablement sur la conversion de RmI en P155. Notez que certaines constructions, ne touchant que le codon d'initiation de VP3, mais n'affectant pas la production de VP2 et VP1 auraient permis de démontrer si l'absence de VP3 aurait un effet sur la recombinaison de RmI. Ces constructions devront être générées pour la poursuite de ces travaux.

Des essais de complémentation ont également été tentés avec des vecteurs d'expression. L'apport exogène des protéines mineures aurait pu démontrer leur implication au niveau de la recombinaison. Effectivement, le retour au phénotype sauvage des mutants RmI par un apport des protéines tardives en trans aurait ajouter aux preuves de leur implication. Malheureusement, les essais de co-transfection tentés dans cette étude n'ont pas permis d'apporter les éléments de réponse souhaités. Les premiers

vecteurs d'expression utilisés dans les co-transfections découlaient de la molécule pEGFP-N1 ( Matériel et méthodes ) Mais, comme le montre la figure 16B, les vecteurs ne pouvaient persister dans nos cellules. Effectivement, leur dégradation rapide fait d'eux des vecteurs non appropriés pour notre système. Il est possible qu'une production massive des protéines mineures par ces vecteurs engorge les cellules, ce qui engendre leur mort quelques heures après la transfection. Une autre hypothèse expliquant cette disparition de l'ADN de nos vecteurs serait l'incapacité de l'origine de Py à assurer la réplication des molécules. Une réplication inefficace se traduit alors par une accumulation décroissante dans le temps. Étant inadéquat pour notre système, les vecteurs de type pCMV OriPy ont été abandonnés.

Un second type de vecteur d'expression a alors été mis à l'épreuve, les pLRP. Constitués de la portion tardive de la souche A3 de polyome, ces vecteurs peuvent répondre aux exigences de notre système (figure 8). La réplication et l'expression des gènes des vecteurs pLRP sont régulées par les mêmes éléments que ceux de RmI ou de Py ce qui permet l'apport des protéines voulues au moment opportun. L'accumulation des vecteurs de type pLRP semble donc être adéquate comme en témoigne la figure 17B après une incubation des cellules pendant 3 jours. L'analyse de leur capacité à produire les protéines tardives apporta cependant un élément décevant. Bien que capable de s'accumuler dans les cellules, la production des protéines tardives est plus faible que ce que l'on attendait. Dès que l'on empêche la production de certaines protéines par l'introduction de mutations, la capacité de production du vecteur chute considérablement (figure 17C). Est-ce qu'on peut penser à l'implication de la région précoce dans la régulation de la production des gènes tardifs? Débarrassée des gènes précoce,

l'expression de la région tardive serait-elle affectée? Pourtant plusieurs études ont démontré que le promoteur tardif est actif même en absence des protéines précoces et que la réplication de l'ADN viral n'est pas nécessaire pour les fonctions du promoteur tardif (Bourachot et al., 1989; Cahill et Carmichael, 1989; Kern et al., 1985). Bien que l'expression des vecteurs pLRP est affaiblie, des essais de co-transfection ont tout de même été lancés avec les mutants de type RmI. Malheureusement, aucun des essais n'a pu apporter une réponse intéressante à ce moment. Persuadé du potentiel de nos constructions, d'autres essais seront assurément tentés afin de mettre au point ce procédé de complémentation par les protéines mineures.

### **C) Modèle de l'implication des protéines mineures dans la recombinaison**

Avec les données que nous avons accumulées jusqu'à maintenant, un modèle global de la recombinaison assistée par les protéines tardives semble prendre forme. On croit que la molécule RmI, lorsque transfectée dans les cellules de souris, peut produire en phase tardive les protéines VPX, VP2 et VP3 sans problème. Ces protéines tardives migrent alors au noyau sous forme de pentamères. Rendu au noyau les complexes VPX/VP2 et VPX/VP3 se lient à l'ADN viral (Chang et al., 1993) et à la matrice dans le but d'entamer, entre autre, le processus d'encapsidation (Stamatos et al., 1987). Bien que RmI n'est pas encapsidable, les protéines tardives peuvent tout de même s'y lier et très probablement entamer une relocalisation des nucléosomes (Ambrose et al., 1990; Blasquez et al., 1986). Cette redistribution des nucléosomes pourrait augmenter alors l'accessibilité du site Y3, dont l'intégrité est importante pour la recombinaison (Gendron et al., 1996), au facteur YY1. Ayant la capacité d'interagir avec les co-activateurs CBP et

p300, dont l'activité HAT(Histone acetyl-tranferase) est bien caractérisée (Ogryzko et al., 1996), le facteur YY1 pourrait ainsi engendrer le déroulement local de l'ADN. La chromatine, dont les histones sont acétylées, adopte une structure plus lâche (Roth et Allis, 1996) ce qui pourrait rendre alors l'ADN plus accessible à des facteurs impliqués dans la recombinaison des répétitions S. Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire démontrent que la RS est un procédé dans lequel l'appariement des séquences répétées S1 et S2 précède l'échange de brin (Bourgau et al., 1990; Frappier et al., 1990; Vu et al., 1991; Vu et al., 1992). Cette séquence des événements semble répondre aux propriétés de certaines recombinaisons eucaryotiques (Hsieh et Camerini-Otero, 1989).

Il ne faut pas non plus négliger le processus de transcription dans ce modèle. Effectivement, plusieurs études antérieures ont démontré l'implication de la transcription au niveau de la recombinaison génétique (Keil et Roeder, 1984; Thomas et Rothstein, 1989; Alt et al., 1986; Blackwell et al., 1986; Stavnezer-Nordgren et Sirlin, 1986; Nickoloff et Reynolds, 1990; Nault et al., 1994). La présence de YY1 au site Y3 pourrait contribuer à stimuler la transcription ou à augmenter la processivité de la machinerie transcriptionnelle ce qui lui permettrait d'engendrer la conversion de RmI en P155. Le transport ou le recrutement d'enzymes, telles les ADN topoisomérases, par la machinerie transcriptionnelle serait également une hypothèse pour expliquer cette implication dans la recombinaison. Ces enzymes capables de modifier le nombre de supertours de l'ADN double brin par l'introduction de cassure double ou simple brin pourrait avoir un rôle dans la recombinaison. La cassure ainsi introduite pourrait ensuite être résolue d'une façon plus mécanique. C'est à dire que le brin libéré par la cassure pourrait être déplacé par l'élongation de la transcription ce qui lui permettrait d'envahir un duplex d'ADN

homologue et ainsi stimuler la recombinaison (Nickoloff et Reynolds, 1990; Ikeda et Matsumoto, 1979).

## **D) Conclusion**

Selon l'étude effectuée par Maryse Bélanger sur VP1 et sa forme tronquée VPX (voir mémoire, 1999) combinée aux expérimentations discutées dans ce document au sujet des protéines mineures VP2 et VP3 certaines hypothèses ont pu être élaborées. Les trois mutations introduites dans les gènes des protéines mineures, nous ont amené des éléments de réponse sur la question de la participation des protéines tardives dans la recombinaison. Les éléments de conclusion pour cette étude sont les suivants: Les protéines mineures du virus du polyome collaborent avec VP1 (ou VPX) pour le transport au noyau des pentamères. Ainsi présentes au noyau, les protéines VP1(VPX), et VP2 semblent stimuler la recombinaison entre les répétitions S chez RmI. Effectivement, l'absence de la protéine mineure VP2 paralyse les activités de recombinaison. Impliquées ainsi probablement dans le repositionnement des nucléosomes amenant la fixation de YY1 sur le site Y3 et dans l'élaboration d'un environnement propice à la recombinaison, les protéines VP2 et VP3 en association avec VP1(ou VPX) favorisent la recombinaison entre les répétitions S chez RmI.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier sincèrement les Docteurs Pierre Bourgaux et Danielle Bourgaux-Ramoisy pour m'avoir accepté dans leur laboratoire et de m'avoir permis d'entreprendre ce projet de recherche.

Je remercie également tous mes collègues de travail Daniel Gendron, Maryse Bélanger et Louis Delbecchi pour leurs précieux conseils et leurs encouragements. Les nombreux moments agréables passés ensemble ne seront jamais oubliés.

Un grand merci au Dr. Richard A. Consigli pour nous avoir gracieusement offert le sérum anti-VP2/VP3 ce qui nous a permis d'économiser un temps considérable.

Un très grand merci à André Lacroix pour les conseils sur la culture cellulaire ainsi que les centaines de pétris que nous lui avons demandés!

Merci également à Carole Picard, Andrée Houle et Normand Laframboise pour leurs nombreux services.

Je salue et je remercie chaleureusement mes amis ainsi que tous les professeurs du département qui ont rendu mon séjour si agréable.

Je remercie particulièrement ma famille, mes amis ainsi que ma copine Claudie qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études.

***“Felix qui potuit rerum cognoscere causas”***



## **Bibliographie**

Alt, FW, Blackwell, TK, DePinho, RA, Reth, MG, Yancopoulos, GD (1986). Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol Rev.* 89 5-30

Ambrose, C, Lowman, H, Rajadhyaksha, A, Blasquez, V, Bina, M (1990). Location of nucleosomes in simian virus 40 chromatin. *J Mol Biol* 214 (4):875-884

Barettino, D, Feigenbutz, M, Valcarcel, R, Stunnenberg, HG (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22 (3):541-542

Barouch, DH, Harrison, SC (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol.* 68 (6):3982-3989

Blackwell, TK, Moore, MW, Yancopoulos, GD, Suh, H, Lutzker, S, Selsing, E, Alt, FW (1986). Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* 324 (6097):585-589

Blasquez, V, Stein, A, Ambrose, C, Bina, M (1986). Simian virus 40 protein VP1 is involved in spacing nucleosomes in minichromosomes. *J Mol Biol* 191 (1):97-106

Bolivar, F, Rodriguez, RL, Greene, PJ, Betlach, MC, Heyneker, HL, Boyer, HW (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (2):95-113

Bourachot, B, Yaniv, M, Herbomel, P (1989). Control elements situated downstream of the major transcriptional start site are sufficient for highly efficient polyomavirus late transcription. *J Virol.* 63 (6):2567-2577

Bourgaux, P (1964). The fate of polyomavirus in hamster, mouse and human cells. *Virology* 23 46-55

Bourgaux, P, Delbecchi, L, Yu, KK, Herring, E, Bourgaux-Ramoisy, D (1978). A mouse embryo cell line carrying an inducible, temperature-sensitive, polyoma virus genome. *Virology* 88 (2):348-360

Bourgaux, P, Gendron, D, Bourgaux-Ramoisy, D (1990). Preferred crossover sites on polyomavirus DNA. *J Virol.* 64 (5):2327-2336

Bourgaux, P, Sylla, BS, Chartrand, P (1982). Excision of polyoma virus DNA from that of a transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct and inverted repeat sequences at the viral-cellular joints. *Virology* 122 (1):84-97

- Cahill, KB, Carmichael, GG (1989). Deletion analysis of the polyomavirus late promoter: evidence for both positive and negative elements in the absence of early proteins. *J Virol.* 63 (9):3634-3642
- Cai, X, Chang, D, Rottinghaus, S, Consigli, RA (1994). Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J Virol* 68 (11):7609-7613
- Chang, D, Cai, X, Consigli, RA (1993). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol.* 10 (6):6327-6331
- Chartrand, P, Gusew-Chartrand, N, Bourgaux, P (1981). Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells. *J Virol.* 39 (1):185-195
- Chen, XS, Stehle, T, Harrison, SC (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17 (12):3233-3240.
- Chow, M, Newman, JF, Filman, D, Hogle, JM, Rowlands, DJ, Brown, F (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327 (6122):482-486
- Clark, B, Desselberger, U (1988). Myristylation of rotavirus proteins. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 10):2681-2686
- Cole, CN, Landers, T, Goff, SP, Manteuil-Brutlag, S, Berg, P (1977). Physical and genetic characterization of deletion mutants of simian virus 40 constructed in vitro. *J Virol.* 24 (1):277-294
- Crawford, LV (1969). Purification of polyomavirus. Fundamental techniques in virology. Academic Press, N.Y. p.75-81.
- Delbecchi, L, Gendron, D, Bourgaux, P (1981). Inducible permissive cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus: superinfection does not allow excision of the resident viral genome. *J Virol.* 39 (1):196-206
- Delos, SE, Montross, L, Moreland, RB, Garcea, RL. (1993). Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology.* 194 (1):393-398
- Diamond, L., Crawford, LV (1964). Some characteristics of large-plaque and small-plaque lines of polyomavirus. *Virology* 22 235-244
- Dulbecco, R, Freeman, G (1959). Plaque production by polyomavirus. *Virology* 8 396-397

- Eckhart, W (1969). Complementation and transformation by temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Virology*. 38 (1):120-125
- Eckhart, W, Dulbecco, R (1974). Properties of the ts3 mutant of polyoma virus during lytic infection. *Virology*. 60 (2):359-369
- Farmerie, WG, Folk, WR (1984). Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (22):6919-6923
- Forstova, J, Krauzewicz, N, Wallace, S, Street, AJ, Dilworth, SM, Beard S, Griffin, BE (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol*. 67 (3):1405-1413
- Frappier, D, Gendron, D, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1990). Alternative homologous and nonhomologous products arising from intramolecular recombination. *J Virol*. 64 (10):5058-5065
- Garcea, RL, Salunke, DM, Caspar, DL. (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329 (6134):86-87
- Gelinas, C, Chartrand, P, Bastin, M (1982). Polyoma virus mutant with normal transforming ability but impaired tumorigenic potential. *J Virol*. 43 (3):1072-1081
- Gendron, D, Delbecchi, L, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1988). A substitution in a nonconserved region of polyomavirus large T antigen which causes a thermosensitive mutation. *Virology*. 165 (1):165-171
- Gendron, D, Delbecchi, L, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1996). An enhancer of recombination in polyomavirus DNA. *J Virol*. 70 (7):4748-4760
- Griffith, JP, Griffith, DL, Rayment, I, Murakami, WT, Caspar, DL (1992). Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature*. 355 (6361):652-654
- Hanathan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 557-580
- Harrison, SC (1990). Principle of virus structure. *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York In B.N. Fields and D.M. Knipe (ed.) 37-61
- Hirano, T, Iwakura, Y (1990). A novel transcriptional regulatory factor that binds to the polyoma virus enhancer in a developmental stage-specific manner. *Biochimie*. 72 (5):327-336
- Holliday, R (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res. Camb.* 5 282-304

- Holliday, R (1974). Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics*. 78 (1):273-287
- Holmes, DS, Quigley, M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114 (1):193-197
- Hsieh, P, Camerini-Otero, RD (1989). Formation of joint DNA molecules by two eukaryotic strand exchange proteins does not require melting of a DNA duplex. *J Biol Chem*. 264 (9):5089-5097
- Ikeda, H, Matsumoto, T (1979). Transcription promotes recA-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (9):4571-4575
- Keil, RL, Roeder, GS (1984). Cis-acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell* 39 (2 Pt 1):377-386
- Kern, FG, Bovi, PD, Basilico, C (1987). A reiterated leader sequence is present in polyomavirus late transcripts produced by a transformed rat cell line. *J. virol* 61 (12):4055-4059
- Kern, FG, Dailey, L, Basilico, C (1985). Common regulatory elements control gene expression from polyoma early and late promoters in cells transformed by chimeric plasmids. *Mol Cell Biol*. 5 (8):2070-2079
- Kern, FG, Pellegrini, S, Cowie, A., Basilico, C (1986). Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J Virol*. 60 (1):275-285
- Krauzewicz, N, Streuli, CH, Stuart-Smith, N, Jones, MD, Wallace, S, Griffin, BE (1990). Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J. Virol*. 64 (9):4414-4420
- Kucherlapati, R, Smith, RG (1988). Genetic recombination. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 731 p.
- Leavitt, AD, Roberts, TM, Garcea, RL (1985). Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli. *J. Biol. Chem*. 260 (23):12803-12809
- Liddington, RC, Yan, Y, Moulai, J, Sahli, R, Benjamin, TL, Harrison, SC (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. 354 (6351):278-284
- Maniatis, T., Fritsch, F., Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor. New York.
- Martelli, F, Iacobini, C, Caruso, M, Felsani, A (1996). Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *J Virol*. 70 (3):1433-1438

Maryse Bélanger (1999) Mémoire :Rôles des protéines virales tardives dans la recombinaison de l'ADN du virus du polyome.

Meselson, MS, Radding, CM (1975). A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72 (1):358-361

Montross, L, Watkins, S, Moreland, RB, Mamon, H, Caspar, DL, Garcea, RL (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65 (9):4991-4998

Moreland, RB, Garcea, RL (1991). Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology.* 185 (1):513-518

Moreland, RB, Montross, L, Garcea, RL (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J Virol.* 65 (3):1168-1176

Nault, C, Fricker, A, Delbecchi, L, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1994). Intramolecular recombination in polyomavirus DNA is a nonconservative process directed from the viral intergenic region. *J Virol.* 68 (9):5439-5447

Nibert, ML, Schiff, LA, Fields, BN (1991). Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein. *J. Virol* 65 (4):1960-1967

Nickoloff, JA, Reynolds, RJ (1990). Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 10 (9):4837-4845

Ogryzko, VV, Schiltz, RL, Russanova, V, Howard, BH, Nakatani, Y (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87 (5):953-959

Paul, AV, Schultz, A, Pincus, SE, Oroszlan, S, Wimmer, E (1987). Capsid protein VP4 of poliovirus is N-myristoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (22):7827-7831

Piché, A, Bourgaux, P (1987). Resolution of a polyomavirus-mouse hybrid replicon: release of genomic viral DNA. *J Virol.* 61 (3):840-844

Rautmann, G, Glaichenhaus, N, Nahgashfar, Z, Breathnach, R, Rassoulzadegan, M (1982). Complementation of a tsa mutant and replication of a recombinant DNA carrying the viral ori region in mouse cells transformed by polyoma virus. *Virology.* 122 (2):306-317

Rayment, I, Baker, TS, Caspar, DL, Murakami, WT (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295 (5845):110-115

Roth, DB, Wilson, JH (1985). Relative rates of homologous and nonhomologous recombination in transfected DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (10):3355-3359

Roth, SY, Allis, CD (1996). Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? *Cell* 87 (1):5-8

Rubnitz, J, Subramani, S (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 4 (11):2253-2258

Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA, Arnheim, N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 24 476-480

Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* 24 104-108

Schlissel, MS, Baltimore, D (1989). Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* 58 (5):1001-1007

Soeda, E, Arrand, JR, Griffin, BE (1980). Polyoma virus DNA: complete nucleotide sequence of the gene which codes for polyoma virus capsid protein VP1 and overlaps the VP2/VP3 genes. *J Virol.* 33 (2):619-630

Stamatos, NM, Chakrabarti, S, Moss, B, Hare, JD (1987). Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J Virol.* 61 (2):516-525

Stavnezer-Nordgren, J, Sirlin, S (1986). Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J.* 5 (1):95-102

Stewart, SE, Roeder, GS (1989). Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 9 (8):3464-3472

Sylla, BS, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1980). Induction of viral DNA synthesis in clonal derivatives of a permissive cell line transformed by a temperature-sensitive polyoma virus. *Virology* 100 (2):357-369

Sylla, BS, Huberdeau, D, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1984). Site-specific excision of integrated polyoma DNA. *Cell* 37 (2):661-667

Szostak, JW, Orr-Weaver, TL, Rothstein, RJ, Stahl, FW (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33 (1):25-35

Thomas, BJ, Rothstein, R (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56 (4):619-630

Tooze, J (1980). Molecular Biology of Tumor Virus. DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Twigg, AJ, Sherratt, D (1980). Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. *Nature*. 283 (5753):216-218
- Voelkel-Meiman, K, Keil, RL, Roeder, GS (1987). Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* 48 (6):1071-1079
- Vogt, M (1970). Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyomavirus. I. Isolation and characterization of Ts-a-3T3 cells. *J Mol Biol*. 47 (3):307-316
- Vu, HK, Delbecchi, L, Bourgaux-Ramoisy, D, Bourgaux, P (1991). The same mammalian replicon yields distinct recombination products in different cell lines. *J Biol Chem*. 266 (14):9320-9326
- Vu, HK, Delbecchi, L, Quevillon, M, Herring-Gillam, E, Bourgaux, P (1992). Crossover site selection during recombination of polyomavirus replicons. *J Virol*. 66 (5):3210-3213
- Wake, CT, Wilson, JH (1980). Defined oligomeric SV40 DNA: a sensitive probe of general recombination in somatic cells. *Cell* 21 (1):141-148